



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**QUAL O TIMING DE ATAQUE ÁCIDO NUMA RESINA
INFILTRANTE DE ESMALTE APÓS REMINERALIZAÇÃO COM
CPP-ACP?**

Trabalho submetido por
Ana Sofia Fernandes Jorne
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

outubro de 2018



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

QUAL O TIMING DE ATAQUE ÁCIDO NUMA RESINA INFILTRANTE DE ESMALTE APÓS REMINERALIZAÇÃO COM CPP-ACP?

Trabalho submetido por
Ana Sofia Fernandes Jorne
para a obtenção do grau de **Mestre** em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Prof. Doutora Ana Cristina Manso
e coorientado por
Prof. Doutora Carla Ascenso

outubro de 2018

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais,
Se o meu espírito for forte como o vosso,
sem dúvidas vencerá.*

AGRADECIMENTOS

À Prof. Doutora Ana Cristina Manso, pela orientação, pelo rigor transmitido, perfeccionismo e profissionalismo demonstrados que me permitiram a realização deste trabalho.

À Prof. Doutora Carla Ascenso pela coorientação, pela ajuda com a análise estatística e pelo sorriso constante.

À Mestre Joana Carmo, pelo apoio constante, pela paciência e entusiasmo que me ajudaram nesta caminhada.

Ao professor Mário Polido, por permitir a realização deste estudo no laboratório de biomateriais.

À Cooperativa de Ensino Superior Egas Moniz, pela excelência de ensino e espírito que incute aos seus alunos.

À Direção Clínica, pela qualidade de ensino que proporciona aos alunos e pelas constantes inovações realizadas ao longo dos anos.

À AEISCSEM, pelas lições de vida, por me ensinar o que trabalho de equipa consegue concretizar e pelas memórias inesquecíveis.

Aos meus pais, irmão e família. Não consigo expressar o quanto o vosso apoio foi essencial nesta etapa da minha vida, e o quanto vos agradeço pelo amor incondicional e por sempre acreditarem em mim.

Ao Miguel Chaves. Fizeste com que esta etapa se tornasse a melhor aventura, sempre lá do início ao fim. O futuro é nosso.

Aos meus amigos, pelas longas noites de estudo e diversão, pelas memórias vividas, pelo apoio e humanidade que demonstraram. Levo-vos para a vida.

RESUMO

Objetivos - Quantificar a microdureza de superfície do esmalte após indução artificial de cárie, quando se aplica um pré-tratamento com Caseína Fosfopetídeo – Fosfato de Cálcio Amorfo, seguido de uma aplicação de uma resina infiltrante de esmalte, com distintos tempos de ataque ácido.

Materiais e métodos – 48 espécimes foram obtidos a partir de 12 molares humanos e aleatoriamente distribuídos em 4 grupos (A-D). Todos os grupos passam por indução artificial de *white spot* através de solução tampão de ácido láctico durante 6 dias, e tratamento com CPP-ACP durante 4 semanas. O grupo A não passa por mais nenhum tratamento, enquanto que os grupos B-D são tratados com resinas infiltrantes com diferentes *timings* de condicionamento ácido, de 2, 3 e 4 minutos respectivamente. Após tratamento foram selecionados, aleatoriamente, 10 espécimes que foram submetidos a teste de microdureza de superfície através da técnica de Vickers e 2 espécimes foram visualizados através de microscopia eletrônica de varrimento (MEV). Na análise estatística foram aplicados os testes ANOVA a um fator e o *post-hoc* de Games-Howell, considerando um nível de significância de 5%.

Resultados – Foram demonstradas diferenças na microdureza entre grupos ($p < 0,05$). No entanto, as médias do grupo A e B não diferem significativamente entre si ($p = 0,128$), nem as dos grupos C e D ($p = 0,686$). Já as médias de B e C diferem estatisticamente ($p = 0,001$). Segundo a análise a MEV, o grupo A apresenta-se mais homogêneo com menor exposição de lacunas comparativamente com os grupos B, C e D, que se apresentam mais heterogêneo.

Conclusões – O grupo A tratado com CPP-ACP e o grupo B tratado com CPP-ACP e com 2 minutos de condicionamento ácido apresentam valores semelhantes de microdureza. Os grupos C e D com condicionamento ácido superior a 2 minutos apresentam microdureza inferior, sugerindo maior desmineralização.

Palavras-chave: fosfato de cálcio, remineralização, *white spot*, resina infiltrante

ABSTRACT

Objectives – To quantify the surface microhardness of the enamel after artificial induction of caries, when a pretreatment with Casein Fosfopetidea - Amorphous Calcium Phosphate is applied, followed by an enamel infiltrating resin, with different times of acid attack.

Materials and methods – 48 specimens were obtained from 12 human molars and randomly distributed in 4 groups (A-D). All groups undergo artificial white spot induction through lactic acid buffer solution for 6 days, and CPP-ACP treatment for 4 weeks. Group A does not undergo any further treatment, while the groups B-D were treated with infiltrating resins with different acid conditioning timings, 2, 3 and 4 minutes respectively. After treatment, 10 randomly selected specimens were submitted to a surface microhardness test by Vickers technique and 2 randomly selected specimens were visualized by scanning electron microscopy (SEM). Statistical analysis was performed using the one-way ANOVA test and the post-hoc Games-Howell,

Results – Differences in microhardness between groups were demonstrated ($p < 0.05$). However, the means of group A and B did not differ significantly between themselves ($p = 0.128$), neither those of groups C and D ($p = 0.686$). The mean values of B and C differ statistically ($p = 0.001$). According to the SEM analysis, group A is more homogeneous with less exposure of gaps compared to groups B, C and D, which are more heterogeneous.

Conclusions – Group A treated with CPP-ACP and group B treated with CPP-ACP and with 2 minutes of acid conditioning presented similar values of microhardness. Groups C and D with acid conditioning for more than 2 minutes have a lower microhardness, suggesting a greater demineralization.

Keywords: Calcium phosphate, remineralization, white spot, resin infiltration

ÍNDICE

RESUMO	1
ABSTRACT	2
ÍNDICE DE FIGURAS.....	5
ÍNDICE DE TABELAS.....	9
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	10
I.INTRODUÇÃO:	11
1. Esmalte.....	13
2. Saliva	15
3. Cárie Dentária.....	17
4. Remineralização	20
5. Resinas Infiltrantes	22
6. Pertinência do estudo	24
7. Objetivos do estudo	25
8. Hipótese nula.....	25
II. MATERIAIS E MÉTODOS	27
1. Desenho do estudo.....	27
2. Local do estudo.....	28
3. Considerações éticas	28
4. Seleção da amostra	28
5. Preparação da amostra	28
6. Polimento da amostra.....	29
7. Simulação das lesões artificiais de <i>white spot</i>	30
8. Aleatorização das amostras e aplicação de CPP-ACP e ICON®.....	30
9. Análise da superfície preparada	35
9.1. Teste de microdureza de Vickers	35

9.2. Microscópio eletrônico de varrimento.....	36
9.3 Análise Estatística	38
III. RESULTADOS	39
1. Teste de Microdureza de Vickers	39
2. Microscópio eletrônico de varrimento.....	43
IV. DISCUSSÃO.....	51
1. Teste de Microdureza de Vickers	51
2. Microscópio eletrônico de varrimento.....	55
3. Limitações do estudo	57
4. Perspetivas para futuros estudos.....	57
V. CONCLUSÕES	59
VI. BIBLIOGRAFIA:	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma respetivo ao estudo	27
Figura 2. Micrótopo de tecidos duros Accutom-50.....	29
Figura 3. Máquina de Polimento LaboPol-4®	30
Figura 4. Ácido Láctico	31
Figura 5. Estufa Memmert INE 400, (Mettmert, Alemanha).....	31
Figura 6. Saliva artificial.....	32
Figura 7. CPP-ACP– GC Tooth Mousse, <i>Recaldent™</i>	33
Figura 8. Seringa de ICON®.....	34
Figura 9. Teste de microdureza de Vickers.....	36
Figura 10. Exemplo de Indentação do teste de microdureza de Vickers.....	36
Figura 11. Microscópio Eletrónico de Varrimento (JEOL JSM-700001F).....	37
Figura 12. Metalização dos espécimes no Quorum Technologies modelo Q150TES ..	37
Figura 13. Diagrama representativo da variância de valores obtidos em cada grupo ...	40
Figura 14. Representação gráfica dos valores médios obtidos de cada grupo.....	42
Figura 15. A1. Visão panorâmica sobre a superfície de esmalte a x1000 após indução artificial de <i>white spot</i> e remineralização com CPP-ACP. Observam-se fraturas de tensão por desidratação.....	43
Figura 16. A1. Visão panorâmica sobre a superfície de esmalte a x5000 após indução artificial de <i>white spot</i> e remineralização com CPP-ACP	44

- Figura 17. A1. Visão panorâmica sobre a superfície de esmalte a x10000 após indução artificial de *white spot* e remineralização com CPP-ACP. Começam a ser evidente as lacunas na camada de esmalte..... 44
- Figura 18. A1. Visão panorâmica sobre a superfície de esmalte a x30000 após indução artificial de *white spot* e tratamento com CPP-ACP. É visível as zonas em que existem falhas na estrutura cristalina do esmalte devido à desmineralização induzida e outras compensadas pelo complexo 45
- Figura 19. B1 - Visão panorâmica sobre a transição da superfície de esmalte a x1000 após indução artificial de *white spot*, tratamento com CPP-ACP e resina infiltrante e a zona de esmalte sem resina. Consegue-se observar a zona em que o esmalte não foi tratado com resina pois encontra-se mais heterogêneo e os primas mais visíveis..... 45
- Figura 20. B1 - Visão panorâmica sobre a transição da superfície de esmalte a x5000 após indução artificial de *white spot*, tratamento com CPP-ACP e resina infiltrante e a zona de esmalte sem resina. É de notar a obturação das lacunas de esmalte pela resina infiltrante..... 46
- Figura 21. B1 - Visão panorâmica sobre a transição da superfície de esmalte a x10000 após indução artificial de *white spot*, tratamento com CPP-ACP e resina infiltrante e a zona de esmalte sem resina. É de notar a obturação das lacunas de esmalte pela resina infiltrante..... 46
- Figura 22. C1 - Visão panorâmica sobre a transição da superfície de esmalte a x1000 após indução artificial de *white spot*, tratamento com CPP-ACP e resina infiltrante (protocolo de 3 minutos de condicionamento ácido) e a zona de esmalte sem resina. De notar que existe uma desmineralização maior atendendo a lacunas de maior diâmetro observando-se o efeito de “favo de mel” 47
- Figura 23. C1 - Visão panorâmica sobre a transição da superfície de esmalte a x5000 após indução artificial de *white spot*, tratamento com CPP-ACP e resina infiltrante e a zona de esmalte sem resina. Os prismas de esmalte ficam cobertos pela resina quer na superfície quer no seu preenchimento..... 47

- Figura 24. C1- Visão panorâmica sobre a transição da superfície de esmalte a x10000 após indução artificial de *white spot*, tratamento com CPP-ACP e resina infiltrante e a zona de esmalte sem resina..... 48
- Figura 25. D1 - Visão panorâmica sobre a transição da superfície de esmalte a x1000 após indução artificial de *white spot*, tratamento com CPP-ACP e resina infiltrante (protocolo de 4 minutos de condicionamento ácido) e a zona de esmalte sem resina 48
- Figura 26. D1 - Visão panorâmica sobre a transição da superfície de esmalte a x5000 após indução artificial de *white spot*, tratamento com CPP-ACP e resina infiltrante e a zona de esmalte sem resina com mais espaços lacunares..... 49
- Figura 27. D1 - Visão panorâmica sobre a transição da superfície de esmalte a x10000 após indução artificial de *white spot*, tratamento com CPP-ACP e resina infiltrante e a zona de esmalte sem resina com mais espaços lacunares. Observa-se maior desorganização cristalina 49

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados dos respectivos grupos.....	39
Tabela 2 -Resultados do teste de Normalidade de Shapiro-Wilk	40
Tabela 3 -Teste de Homogeneidade de Variâncias de Levene	41
Tabela 4 -Resultados do teste paramétrico ANOVA a um fator aplicado aos grupos de trabalho A-D, considerando IC=95%	41
Tabela 5 -Teste de Gomes-Howell	42
Tabela 6 -Somatório das imagens de análise do microscópio eletrônico de varrimento dos diversos grupos.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

CPP-ACFP – Casein Phosphopeptide – Amorphous Calcium Fluoride Phosphate

CPP-ACP - Casein Phosphopeptide – Amorphous Calcium Phosphate

FA – Fluorapatite

Fig. – Figura

g. – Grama

° – Graus

°C – Graus Centígrados

HCl – ácido clorídrico

HV – Hardness Vickers

MEV – microscopia eletrônica de varrimento

mL – mililitro

mm – milímetro

μm – Micrómetro

nm – nanómetro

N – Newton

PRP – Proteínas ricas em prolina

Ppm – Partes por milhão

% – Percentagem

pH – Potencial Hidrogénico

Rpm – Rotações por minuto

RI – índice refratário

SEM – Scanning Electron Microscopy

WSL – White Spot Lesion

I.INTRODUÇÃO:

O impacto que a cárie dentária tem na saúde das populações continua a ser grande, embora a sua prevalência, incidência e gravidade tenham diminuído em grande parte dos países desenvolvidos desde a introdução do flúor (J. Li et al., 2014). Esta doença oral resulta do metabolismo das bactérias da placa bacteriana específicas existentes na placa bacteriana, que acidificam o meio oral e destroem os tecidos dentários adjacentes. O primeiro indício de cárie de esmalte tem o nome de “white spot lesion”(WSL), que precede a cavitação, sendo o seu diagnóstico precoce de extrema importância (Torres, Borges, Torres, Gomes, & Oliveira, 2011). Quando a sua detenção e tratamento são feitos de forma precoce, as WSL são controladas, e o avanço da cárie é interrompido.

Na última década, o foco na investigação sobre a cárie mudou para o desenvolvimento de metodologias para a deteção precoce de lesões de cárie e abordagem não invasiva das mesmas através da remineralização para preservar a estrutura dentária (Ismail et al., 2013).

As WSL estão associadas a uma população mais jovem, o que torna a opção minimamente invasiva ainda mais prioritária, isto porque é indesejável um comportamento mais invasivo com consequente perda de maior estrutura dentária precocemente (Lee, Kim, Park, & Cho, 2013).

As WSL são lesões de desmineralização não cavitadas, passando o seu tratamento por uma abordagem não-invasiva, como a aplicação tópica de verniz de flúor, de modo a reverter ou cessar o seu progresso (Ferreira, Aragão, Rosa, Sampaio, & Menezes, 2009). A remineralização é o processo natural de reparação das lesões não cavitadas, e depende dos iões de cálcio e fosfato disponíveis, que com o auxílio do flúor, levam a reabilitação da estrutura cristalina remanescente após a desmineralização. Os iões de flúor incorporam-se na estrutura de esmalte, alterando a hidroxiapatite por fluoroapatite, que tem resistência até um pH mais baixo do que a forma original (Güçlü, Alaçam, & Coleman, 2016).

O flúor tem, portanto, um papel fundamental na prevenção e controlo das lesões de cárie. No entanto, este nem sempre é suficiente para conter com sucesso o avanço da

patologia, isto porque depende muito da cooperação do paciente, bem como dos seus hábitos prejudiciais para a saúde oral (Torres, Rosa, Ferreira, & Borges, 2012) .

Surgiram então opções terapêuticas não-invasivas para tratar as WSL como fosfato de cálcio amorfo estabilizado com fosfato de caseína [CPP-ACP], que mantem altos níveis de iões de cálcio e fósforo na proximidade do esmalte, permitindo a remineralização mais rápida e eficaz (Duraismy, Xavier, Nayak, Reddy, & Rao, 2015).

A opção terapêutica mais recente do tratamento das WSL são as resinas infiltrantes. Esta técnica de infiltração de resina previne uma progressão adicional da lesão usando uma resina de baixa viscosidade com um alto coeficiente de penetração, preenchendo os espaços de desmineralização do esmalte (Abdullah & John, 2016).

Tendo em conta, que estas resinas têm sido cada vez mais utilizadas, quer pelo seu carácter curativo, quer pelo estético, é de extrema importância compreender se existem diferenças na microdureza de superfície do esmalte remineralizado com CPP-ACP quando se aplica uma resina infiltrante de esmalte, com distintos tempos de ataque ácido.

1. Esmalte

O esmalte é o tecido mais duro do organismo humano, rodeado por um ambiente oral característico que auxilia na estabilidade e proteção do dente (West & Joiner, 2014). Os cristais de hidroxiapatite são os minerais mais abundantes no esmalte, com a fórmula estequiométrica de $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$, e apresentam uma forma hexagonal e agrupados em túbulos com diâmetro de 4 μm . O esmalte consiste numa matriz inorgânica (96% - cristais de hidroxiapatite) e de constituintes orgânicos (4% - proteínas, lípidos e água) (Li, Wang, Joiner, & Chang, 2014; Teruel, Alcolea, Hernández, & Ruiz, 2015).

Os cristais de apatite em termos de dimensões apresentam-se longos (até 1mm) com 25nm de espessura e 50nm de largura, estendendo-se desde a dentina até ao esmalte superficial (X. Li et al., 2014). Os prismas são perpendiculares à junção amelodentinária e os cristais de hidroxiapatite são paralelos ao longo eixo do próprio prisma (Zhang, Du, Zhou, & Yu, 2014).

Existem alterações na estrutura dos cristais de hidroxiapatite na localização dos centros aniônicos e catiónicos. A nível dos centros catiónicos (Ca^{2+}), pode haver uma substituição na composição por sódio (Na^+), potássio (K^+) e magnésio (Mg^{2+}); a nível dos centros aniônicos (OH^- , PO_4^{3-}) podem ser incorporados fluoretos (F^-), e cloreto (Cl^-) na posição hidroxilo, e CO_3^{2-} em ambas as posições (Teruel et al., 2015).

Essas substituições têm um efeito profundo no comportamento da hidroxiapatite, em especial no que diz respeito à sua solubilidade a baixo pH. A substituição do ião hidroxilo por ião flúor aumenta a sua resistência à desmineralização ácida devido à estrutura, após substituição, apresentar um pH crítico inferior aquele que a estrutura original apresenta (West & Joiner, 2014).

Já a deficiência de cálcio na sua localização torna a estrutura mais suscetível ao ataque ácido proveniente do meio e por isso a hidroxiapatite torna-se mais solúvel (Featherstone, 2008).

Quanto às propriedades mecânicas, estão incluídas a elasticidade, dureza, viscoelasticidade e resistência à fratura. A dureza e o módulo de elasticidade decrescem

centripetamente até à junção amelodentinária, são mais elevadas na superfície dos prismas que na zona da cauda e na zona axial do mesmo. A resistência à fratura aumenta do exterior para o interior (Zhang et al., 2014).

Teste de microdureza de Vickers

A dureza é comumente usada para caracterizar a capacidade de resistir à deformação e à fratura. Os testes usam índices, nomeadamente os testes de Vickers e Knoop. A dureza de Vickers pode ser obtida calculando a área de indentação segundo uma força aplicada durante um determinado intervalo de tempo, sendo essa indentação feita por uma pirâmide quadrada de diamante (Zhang et al., 2014). Sendo a indentação feita em forma de quadrado, em que ambas as diagonais são usadas no cálculo de valores de dureza, apresenta resultados mais fiáveis (Lippert & Lynch, 2014).

O teste de Vickers é considerado simples e relativamente fiável para fornecer informação indireta sobre as mudanças no conteúdo mineral dos tecidos duros dentários e é utilizado comumente para esse fim em estudos *in vitro* (Elkassas & Arafa, 2014).

O conteúdo mineral e a densidade dos cristais e dos prismas não são uniformes em toda a dimensão do esmalte, sendo inferior na zona cervical e mais elevado em zonas de maior espessura, levando a diferentes comportamentos mecânicos nas propriedades acima mencionadas (West & Joiner, 2014).

Microscopia eletrónica de varrimento

De forma a analisar a microestrutura da camada superficial de esmalte, variados estudos *in vitro* utilizam microscopia eletrónica de varrimento (MEV). Este microscópio apresenta capacidade de visualizar estruturas com alta resolução, permite examinar a topografia dimensional e distribuição de características distintas (Fischer, Hansen, Nair, Hoyt, & Dorward, 2012).

O MEV é uma instrumento complementar ao estudo, que auxilia a avaliação das alterações microscópicas da superfície tratada induzida por diversos agentes remineralizantes ou opções terapêuticas (Elkassas & Arafa, 2014).

Este método de análise pode ajudar a formular hipóteses sobre a infiltração de resinas, avaliar alterações devido a remineralização da superfície de esmalte, bem como fornecer informações úteis sobre as mudanças estruturais que ocorrem nos cristais de esmalte após indução artificial de lesões de *white spot* (Prajapati et al., 2017).

2. Saliva

A importância da saliva na manutenção da saúde oral torna-se evidente quando encontramos doentes com a secreção salivar afetada. Doentes que apresentam uma redução na secreção salivar estão muito mais suscetíveis a cáries e a infecções fúngicas (van 't Hof, Veerman, Nieuw Amerongen, & Ligtenberg, 2014). Estima-se que o número total de bactérias na cavidade oral exceda as 10^9 , sendo que a saliva, com as suas propriedades antibacterianas, previne a colonização ilimitada das bactérias presentes, em vez de erradicar a microflora oral.

A saliva apresenta como funções a lubrificação das mucosas, ajuda na formação do bolo alimentar, tem capacidade tampão neutralizando os ácidos produzidos pela metabolização bacteriana, permite a remineralização dentária apresentando um meio saturado em cálcio e fosfato (Carpenter, 2013; Proctor, 2016).

A secreção salivar é feita na maioria pelas glândulas salivares maiores (parótida, submandibular, sublingual). A glândula parótida é a maior responsável pelo fluxo salivar (até 60%) contribuindo em grande parte para a saliva estimulada, quer pelo estímulo do sabor quer pela mastigação, e contribui pouco para a saliva não estimulada, contendo uma secreção rica em amilase salivar e proteínas ricas em prolina (PRP). As glândulas submandibular e sublingual são menos influenciáveis pela dieta e contribuem mais para a saliva não estimulada. Existem ainda centenas de glândulas salivares menores na submucosa ao longo da cavidade oral, que contribuem em menor quantidade para o fluxo salivar mas apresentam uma secreção rica em mucinas (Eliasson & Carlén, 2010).

A saliva tem na sua constituição componentes orgânicos, como proteínas, glicoproteínas, glucose e ureia, e como componentes inorgânicos cálcio, fosfato e flúor. As proteínas mais prevalentes são as proteínas ricas prolina, amilase, mucina, secretora de IgA e anidrase carbônica (Marsh, Do, Beighton, & Devine, 2016).

A saliva possui várias propriedades biológicas que protegem os dentes contra a desmineralização, nomeadamente o seu conteúdo de bicarbonatos que fornecem iões constantes que interagem com a superfície do dente e ajudam na resistência às alterações de pH, neutralizando os ácidos que levam à desmineralização (Buzalaf, Hannas, & Kato, 2012).

A capacidade de prevenção da desmineralização que o esmalte possui passa por atuar nos próprios ácidos diluindo-os e neutralizando-os, formar uma camada protetora entre os agentes desmineralizantes e a superfície do esmalte e fornecer um ambiente saturado em cálcio, fosfato e flúor contribuindo para a remineralização (Hara & Zero, 2014).

Como função de proteção a saliva contribui ainda para a formação da película adquirida, que começa com a ligação de fosfoproteínas, incluído proteínas ricas em prolina, estatina e histatina à superfície do esmalte formando uma camada protetora de 10-20nm de espessura (van 't Hof et al., 2014; Vukosavljevic, Custodio, Buzalaf, Hara, & Siqueira, 2014).

A película adquirida protege o dente contra a desmineralização, criando uma barreira de difusão natural inibindo o contacto direto entre a superfície e os ácidos da alimentação, diminuindo as taxas de difusão dos iões de cálcio e fosfato no fluído adjacente impedindo grandes níveis de desmineralização.

A sua eficácia é diretamente proporcional à espessura da camada, que é maior nas superfícies linguais dos dentes inferiores uma vez que estes se encontram em constante contacto com a saliva secretada pelas glândulas sublingual e submandibular (Vukosavljevic et al., 2014).

Quando o pH na cavidade oral desce, as concentrações de OH^- e PO_4^{3-} são reduzidas e, portanto, o grau de saturação é reduzido, e até ao “pH crítico”, ou seja, até ao pH que se considera uma solução saturada, não existe dissolução do mineral. No entanto, abaixo do pH crítico, o sistema torna-se insaturado e existe potencial para desmineralização. O pH crítico do esmalte é aproximadamente 5,5 (Lussi, Schlueter, Rakhmatullina, & Ganss, 2011; West & Joiner, 2014). As concentrações de cálcio e fosfato nos fluídos orais em contacto com o esmalte influenciam o grau de saturação.

Apesar de todos os efeitos protetores que a saliva possui, manter os níveis necessários de cálcio e fosfato para prevenção da desmineralização em muitos casos é insuficiente o papel da saliva, e como tal são utilizados agentes remineralizantes (Elkassas & Arafa, 2014).

Saliva artificial

Os estudos *in vitro* procuram recriar as condições naturais do meio que querem estudar. A saliva não só faz parte do ambiente oral, como tem um papel essencial na manutenção da saúde oral. Não é possível recriar uma fórmula sintética idêntica à saliva natural, devido à sua complexidade e variabilidade da composição, ao número de fatores variáveis que a influenciam, bem como as interações entre os seus componentes (Leung & Darvell, 1997).

Simultaneamente, o uso de saliva humana em estudos *in vitro* é difícil devido à sua composição variável e falta de estabilidade fora da cavidade oral. Assim, o principal objetivo do uso de preparações sintéticas é obter um ambiente estável e procedimentos padronizados em testes *in vitro* numa vasta gama de estudos (J Pytko-Polonczyk, Jakubik, Przeklasa-Bierowiec, & Muszynska, 2017).

3. Cárie Dentária

A cárie dentária continua a ser uma das doenças mais prevalentes que afeta a espécie humana (Elkassas & Arafa, 2014; Rugg-Gunn, 2013). É uma doença multifatorial e como tal o seu desenvolvimento envolve um complexo relacionamento, ao longo do tempo, entre as bactérias cariogénicas presentes no biofilme da superfície dos dentes, o substrato resultante da dieta que é metabolizado e os fatores intrínsecos ao hospedeiro (Fejerskov, 2004; Tao et al., 2018). A cárie dentária é causa primária de dor oral e perda dentária.

A doença apresenta-se como uma destruição local dos tecidos duros suscetíveis aos ataques dos ácidos produzidos pelas bactérias aquando da fermentação dos hidratos de carbono da dieta. O início da desmineralização ocorre dentro do biofilme bacteriano (placa bacteriana) que cobre a superfície do dente e por isso as mudanças muito precoces

não são facilmente detetadas (Selwitz, Ismail, & Pitts, 2007). Esta desmineralização pode ser inicialmente reversível, porém se progredir para cavitação poderá apenas ser retida, o que pode ser interrompido em qualquer estágio, desde que seja possível eliminar o biofilme. A cárie é uma patologia crónica de evolução lenta na maioria das pessoas, e pode ser observada tanto nas porções coronárias como na zona da raiz, e em dentes decíduos e permanentes (Struzycka, 2014).

A cárie resulta de um desequilíbrio na relação entre o biofilme microbiano oral e os minerais dentários. As bactérias vivem agregadas aos dentes em microcolónias, que são encapsuladas numa matriz orgânica de polissacáridos, proteínas e DNA, secretados pelas células, que fornecem proteção contra a desidratação, as defesas do hospedeiro e proporcionam maior resistência aos agente microbianos (Selwitz et al., 2007).

As espécies bacterianas mais comuns no biofilme são *Streptococcus mutans* e *Lactobacilos* e produzem ácidos orgânicos fracos como subprodutos do metabolismo dos hidratos de carbono fermentáveis. Esses ácidos fazem com que os valores de pH locais desçam abaixo do valor crítico, resultando na desmineralização dos tecidos dentários (Ismail et al., 2013). Os ácidos produzidos incluem ácido láctico capaz de rapidamente dissolver o material mineral do esmalte dentário (Featherstone, 2008). O biofilme em redor do esmalte vai criando condições de insaturação e saturação. A insaturação ocorre em condições ácidas e a partir da perda de iões fosfato e hidroxilo que reagem com os iões de hidrogénio produzido pela atividade metabólica do biofilme. Para restabelecer um equilíbrio, ocorre libertação de minerais como cálcio, fosfato e hidroxilo de fontes como a saliva; estes minerais ficam disponíveis numa solução saturada que banha o esmalte e precipita os minerais, permitindo a remineralização (González-Cabezas, 2010).

O flúor atua como um catalisador para a difusão de cálcio e fosfato, o que remineraliza as estruturas cristalinas. As superfícies cristalinas reconstruídas compostas por hidroxiapatite fluoretada e fluoroapatite são mais resistentes ao ataque ácido da estrutura original, tendo em conta que o pH crítico da fluoroapatite é inferior ao pH crítico da hidroxiapatite.

Existem fatores físicos e biológicos que afetam a predisposição para o desenvolvimento de cáries, esses incluem: fluxo e composição salivar inadequados, altos níveis de bactérias cariogénicas, exposição insuficiente ao flúor, componente

imunológica do hospedeiro, necessidades de saúde especiais e fatores genéticos. Existem fatores controláveis como a má higiene oral, os hábitos alimentares com frequente consumo de hidratos de carbono fermentáveis, o uso frequente de medicação que contém açúcar (Selwitz et al., 2007).

Existem ainda fatores sociais como a pobreza, nível de educação, status social, se tem acesso a cuidados de saúde, e fatores relacionados com os tratamentos prévios como o uso de selantes, uso de aparelho ortodôntico, uso de próteses desadaptadas ou restaurações com margens fraturadas ou debordantes (Curzon & Preston, 2004).

Existe então uma necessidade de prevenir a ocorrência e progressão de cáries. A cárie de esmalte inicial tem como denominação “*white spot*” que são lesões que resultam de uma desmineralização subsuperficial sob uma camada superficial intacta de esmalte com um aspeto mais branco e opaco (Khoroushi & Kachuie, 2017; Selwitz et al., 2007). Existem várias abordagens para a prevenção destas lesões, porém, atualmente, podemos sumariá-las em 3 tipos com maior impacto: controlo do consumo de açúcares na dieta, uso de remineralizantes nas suas várias formas de aplicação, e selantes de fissura (Rugg-Gunn, 2013). Através de programas comunitários, a eficácia dos mesmos na prevenção passa por usar intervenções como a fluoretação das águas comunitárias bem como o sal, programas de bochechos de flúor nas escolas, e acesso a tratamentos com selantes de fissura a nível comunitário (Ismail et al., 2013).

A saliva consegue remineralizar as lesões iniciais até certo ponto, e apesar de contribuir para a reposição mineral superficial, tem pouca eficácia na melhoria da aparência estética da lesão. Para tal, é necessário aplicar agentes remineralizantes para reparar as zonas de desmineralização mais profundas e reparar a estética. A gama de tratamentos com esses agentes inclui métodos com flúor e CPP-ACP, em forma de pasta dentífrica, colutórios, gel ou creme tópicos. (Lapenaite, Lopatiene, & Ragauskaite, 2016).

Numa perspetiva mais atual, a tendência para tratar cáries de modo preventivo ou minimamente invasivo têm vindo a instalar-se. Para que estas opções sejam possíveis o diagnóstico precoce é extramente importante. O diagnóstico padrão universal de cáries é a examinação visual. A nível de cáries interproximais, a visualização nem sempre é possível, e como tal existem métodos radiográficos como as radiografias de asa de mordida (bite wings) que contribuem para o diagnóstico. Porém, estas parecem identificar

cáries em fases mais avançadas e pouco contribuem para a fase precoce. Apresenta-se ainda o desafio de detetar o estado de atividade da cárie, porque a cárie estando ativa ou inativa apresenta diferentes abordagens de tratamento (Gomez, 2015; Selwitz et al., 2007). Para determinar a atividade de uma cárie devemos avaliar a integridade da superfície da lesão, a presença ou ausência de descontinuidade, a textura, o brilho e a cor da lesão de cárie. Lesões com aparência esbranquiçada opaca ou amarela, com perda de brilho, textura mole após sondagem suave, com presença de placa, consideramos lesões ativas. Lesões com aparência brilhante, esbranquiçada, castanha ou preta, com textura dura à sondagem e sem presença de placa são consideradas lesões inativas (Tikhonova, Feine, Pustavoitava, & Allison, 2014).

Existem vários índices que permitem a classificação da evolução da cárie. O ICDAS (International Caries Classification and Management System) representa o sistema de deteção de cáries mais amplo que existe em termos de comparabilidade, é utilizado na prática clínica de medicina dentária e avalia de forma confiável os estágios iniciais de cárie. Tendo em conta que na atualidade as cáries são detetadas cada vez mais precocemente, torna-se bastante importante este índice ser eficaz na avaliação de fases iniciais, para que estas lesões se mantenham nessas fases (Neuhaus, Jost, Perrin, & Lussi, 2015).

No caso da lesão *white spot* o seu ICDAS pode variar de código 1 a 3 no segundo dígito do índice (Shivakumar, Prasad, & Chandu, 2009).

4. Remineralização

As cáries surgem quando existe um desequilíbrio entre a desmineralização e a remineralização. Esta dinâmica está dependente da saturação do meio em minerais essenciais para a manutenção da remineralização dos cristais de esmalte (Memarpour, Soltanimehr, & Sattarahmady, 2015)

O flúor é agente remineralizante mais presente nos produtos de higiene oral, sendo responsável pela diminuição da prevalência de cáries mundialmente. É também o agente mais estudado em comparação com outros agentes e em relação à sua eficácia. (Amaechi & van Loveren, 2013).

A terapia com flúor tem sido o pilar do tratamento não-invasivo para as lesões iniciais de cárie bem como a sua prevenção, sendo a pasta dentífrica a melhor forma de administração de flúor, e a sua aplicação com escova tem como benefício, não só a fonte de remineralizante bem como a remoção mecânica de placa bacteriana (Tao et al., 2018).

Idealmente um agente de remineralização deve difundir ou libertar cálcio e fosfato na lesão superficial ou aumentar as propriedades de remineralização da saliva e reservatórios orais sem aumentar o risco de formação de cálculo. Algumas pastas apresentam um composto de fosfato de cálcio amorfo (ACP), que se encontra numa forma muito instável e transforma-se rapidamente numa fase cristalina mais estável, como a hidroxiapatite, tendo, portanto, menor substantividade. A fraca substantividade leva a que os iões não estejam disponíveis em meio saturado durante tempo suficiente para remineralizar as lesões mais subsuperficiais, visto que mudam de fase para obter estabilidade. Este composto é também altamente solúvel, e em conjunto com a baixa substantividade, levam a que estas pastas de ACP necessitem de ser aplicadas com frequência para terem melhores resultados. No entanto, o uso contínuo a longo prazo leva a promoção da formação de cálculo dentário (Amaechi & van Loveren, 2013)

A caseína fosfopetidea (CPP) é uma fosfoproteína derivada do leite, que estabiliza os iões de fosfato e cálcio em altas concentrações, permitindo criar um ambiente supersaturado em torno do esmalte com biodisponibilidade destes iões necessários à remineralização e que inibem a desmineralização (Reema, Lahiri, & Roy, 2014). Criou-se então este complexo caseína fosfopetidea-fosfato de cálcio amorfo (CPP-ACP).

Este complexo, devido ao CPP tem efeitos antibacterianos e de tampão, e interfere no crescimento e aderência de *Streptococcus mutans*. Ao incorporar fosfato cálcio amorfo na placa bacteriana, diminui a desmineralização do esmalte e aumenta a remineralização. Na placa, CPP-ACP atua como um reservatório de cálcio e fosfato, tamponando os iões livres de cálcio e fosfato, ajudando assim a manter um estado de supersaturação em relação ao esmalte dentário. (J. Li et al., 2014)

O complexo CPP-ACP responde às mudanças de pH, sendo que a sua ligação é menor em casos de ambientes ácidos. Então, quando ocorre uma diminuição de pH existe quebra do complexo sendo libertados iões de cálcio e fosfato, aumentando a saturação

dos mesmos no meio em que está a ocorrer a desmineralização devido ao ambiente ácido. Estes iões vão permitir a remineralização e inibir uma excessiva desmineralização (Reema et al., 2014).

O CPP-ACP interage ainda com os iões fluoreto e produz fosfato de fluoreto de cálcio amorfo (ACFP) que fica estabilizado com CPP na superfície do dente. Este complexo ACFP fornece todos os elementos necessários para promover a remineralização com fluoroapatite, que torna o conteúdo mineral mais resistente aos ataques ácidos futuros (J. Li et al., 2014).

O CPP-ACP tem sido demonstrado em estudos como um eficaz agente de remineralização, nomeadamente no caso de diminuir as lesões de *white spot*. Tem sido uma opção terapêutica recorrente para prevenção destas lesões em doentes de risco como os doentes ortodônticos (Bergstrand, 2011).

5. Resinas Infiltrantes

As resinas infiltrantes não remineralizam a lesão, no entanto são um tratamento que tenta obturar as desmineralizações das *white spot lesion* e tenta também mascará-las de forma a melhorar o aspeto estético destas lesões. A infiltração de resina é baseada na erosão efetuada pelo ácido clorídrico na superfície da lesão e a infiltração posterior de uma resina de baixa viscosidade nos espaços intercristalinos do esmalte hipocalcificado ou desmineralizado (Borges, Caneppele, Masterson, & Maia, 2017). A técnica de infiltração de resina previne a progressão da lesão com o uso de resinas de baixa viscosidade com alto coeficiente de penetração, preenchendo as porosidades que não só são mais suscetíveis à evolução da cárie como são menos estéticas devido à sua opacidade e aspeto esbranquiçado, que através desta técnica esse aspeto é mascarado alterando a cor e a translucidez da lesão de *white spot* (Abdullah & John, 2016).

Para que haja penetração da resina infiltrante, primeiro é necessário preparar a camada mais superficial do esmalte que sofre remineralização constante e está com aspeto intacto, é preciso remover essa camada para que a resina entre nas porosidades eficazmente, o que é obtido com um condicionamento ácido com gel de ácido clorídrico

durante 2 minutos. A lesão deve ser, posteriormente, bem seca para permitir a ação por capilaridade da resina. Por fim, o infiltrante deve ser aplicado durante o tempo suficiente para que chegue às camadas mais profundas e deve ser fotopolimerizado (Paris & Meyer-Lueckel, 2012).

Os resultados estéticos aquando de uma infiltração total das resinas na lesão são de uma aparência semelhante ao esmalte saudável. O aspeto das lesões de *white spot* é diferente devido aos índices refratários (RI) serem diferentes, em que o índice do esmalte é 1.62, enquanto que o das lesões varia entre o da água (RI=1.33) e do ar (RI= 1.0), dependendo do grau de porosidade. Quanto maior a diferença entre RI, mais evidente se torna a lesão, devido à forma como a luz se dispersa entre os cristais. Quando os poros são infiltrados pelas resinas, o índice ronda RI=1.52, dispersando a luz de uma forma mais semelhante à que os cristais de hidroxiapatite dispersam (Shivakumar & Shivanna, 2011; Subramaniam, Girish Babu, & Lakhotia, 2014).

A remineralização com agentes remineralizantes, como os mencionados acima, é feita a nível de camadas mais superficiais, tratando de forma eficaz as lesões menores e tornando-se insuficiente em lesões mais profundas tratadas isoladamente com remineralizantes. Muitas lesões ficam visíveis e o seu tratamento, bem como a capacidade de retomar a aparência estética passam pelo uso de resinas infiltrantes, em lesões que sejam ativas, não cavitadas e inestéticas (Eckstein, Helms, & Knösel, 2015).

Estudos mostram que as WSL conseguem ser mascaradas na totalidade em 61% dos casos. No entanto, em casos em que a camada superficial não for bem removida pelo condicionamento, a eficácia do processo fica seriamente comprometida devido à penetração incompleta, levando a resultados estéticos menos favoráveis. Quanto à progressão da doença, em estudos com doentes de médio risco de cáries, dos doentes tratados com resinas infiltrantes, apenas 4% das lesões progrediram, em comparação com 46% dos doentes do grupo controlo. Em doentes de alto risco, 23% das lesões progrediram nos doentes tratados com resinas infiltrantes, em contraste com o grupo controlo em que 62% progrediu (Paris & Meyer-Lueckel, 2012).

6. Pertinência do estudo

A cárie é das doenças crónicas mais prevalentes a nível global, com suscetibilidade individual ao longo da vida (Gelani, Zandona, Lippert, Kamocka, & Eckert, 2014). O seu impacto negativo a nível de saúde é abrangente, desde dor, má alimentação, interrupções no sono, problemas com a aparência e dificuldades em interações sociais (Locker & Quiñonez, 2009). Nomeadamente nas crianças pode levar a problemas de saúde, nutricionais, de crescimento e desenvolvimento. (Grund, Goddon, Schüller, Lehmann, & Heinrich-Weltzien, 2015)

O primeiro sinal clínico de cárie é a lesão de *white spot*, uma lesão não cavitada considerada reversível. Sendo assim, o diagnóstico precoce desta desmineralização e o seu tratamento levam a que seja possível o controlo deste início de cárie (Torres et al., 2012). Atualmente, as opções não invasivas são aquelas mais escolhidas, pelo o seu carácter preventivo e mais conservador, uma aposta na profilaxia e não na restauração. As WSL são mais comumente tratadas em adolescentes e jovens adultos, pelo que a opção não invasiva, como o CPP-ACP e a opção minimamente invasiva, como as resinas infiltrantes, têm vindo a ser cada vez mais populares (Abdullah & John, 2016).

Cabe ao médico dentista ser capaz de aplicar meios preventivos, de diagnosticar precocemente, bem como tratar da forma menos invasiva possível estas lesões, para tal é necessário um conhecimento abrangente das capacidades de cada remineralizante e a sua aplicação consoante o caso que lhe apresentam, podendo assim evitar a formação, ou pelo menos controlar o avanço das lesões de cárie.

7. Objetivos do estudo

Teve como objetivos o presente estudo:

Quantificar a microdureza de superfície do esmalte após indução artificial de cárie, quando se aplica um pré-tratamento com Caseína Fosfopetidea – Fosfato de Cálcio Amorfo, seguido de uma aplicação de uma resina infiltrante de esmalte, com distintos tempos de ataque ácido;

- Comparar a microdureza de superfície do esmalte após indução artificial de cárie e remineralização com Caseína Fosfopetidea – Fosfato de Cálcio Amorfo, quando se aplica uma resina infiltrante de esmalte, com distintos tempos de ataque ácido;
- Qualificar a superfície do esmalte após indução artificial de cárie e remineralização com Caseína Fosfopetidea – Fosfato de Cálcio Amorfo, quando se aplica uma resina infiltrante de esmalte, com distintos tempos de ataque ácido;

8. Hipótese nula

Não existem diferenças na microdureza de superfície do esmalte remineralizado com Caseína Fosfopetidea – Fosfato de Cálcio Amorfo, quando se aplica uma resina infiltrante de esmalte, com distintos tempos de ataque ácido. Ou seja, formulamos a seguintes hipóteses:

- H_0 : As médias dos grupos não diferem estatisticamente.
- H_1 : As médias dos grupos diferem estatisticamente.

Qual o timing de ataque ácido numa resina infiltrante de esmalte, após remineralização com CPP-ACP?

II. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Desenho do estudo

Foi executado um estudo observacional e analítico em 12 molares humanos íntegros, livres de cáries e fraturas, que foram obtidos de sujeitos anónimos. Destes 12 dentes foram obtidos 48 espécimes que foram divididos em 4 grupos. Em todos os espécimes foram simuladas lesões de cárie artificiais e foram aplicados remineralizantes (Recaldent™ CPP-ACP) durante 4 semanas. No grupo A (n=12), depois do protocolo descrito, 10 espécimes foram submetidos a teste de microdureza de superfície através da técnica de Vickers e 2 espécimes foram visualizados através de microscopia eletrónica de varrimento (MEV). No grupo B foi aplicado o tratamento com ICON®, segundo as normas do fabricante (2 minutos de condicionamento ácido). No grupo C foi aplicado o tratamento com ICON®, com 3 minutos de condicionamento ácido. No grupo D foi aplicado o tratamento com ICON®, com 4 minutos de condicionamento ácido. Dentro de cada grupo B, C e D, 10 espécimes foram submetidos a teste de microdureza de superfície através da técnica de Vickers e 2 espécimes foram visualizados através de microscopia eletrónica de varrimento (MEV). Na figura 1 está representado o fluxograma do estudo.

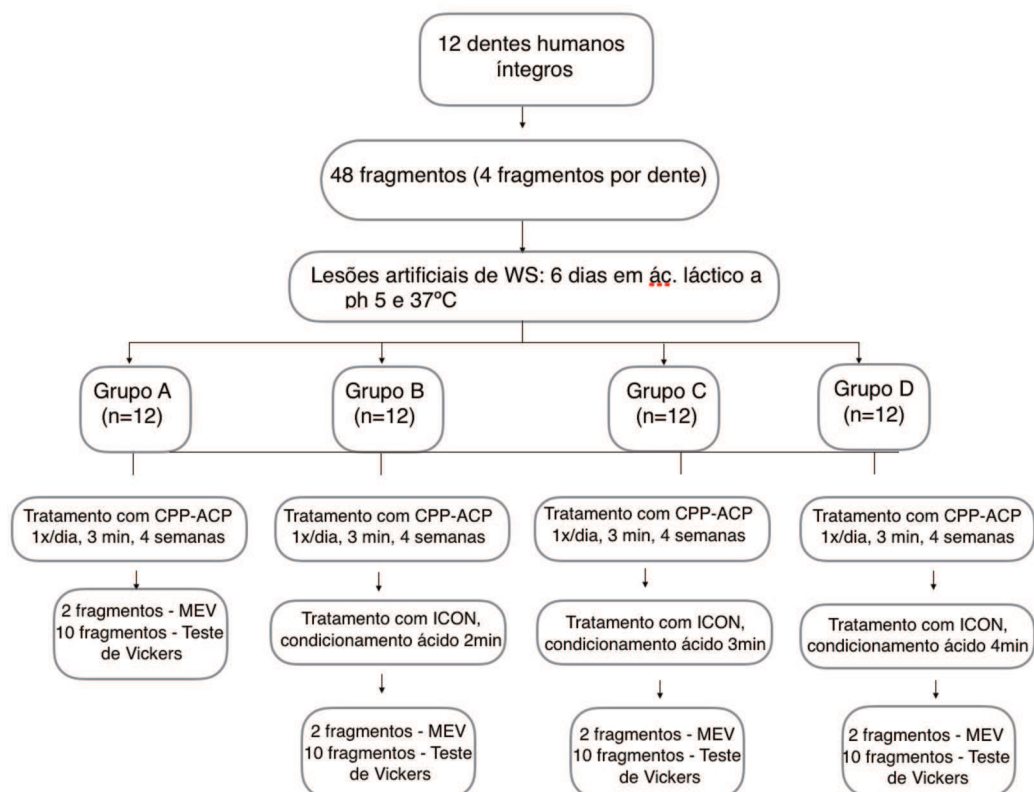


Figura 1 – Fluxograma respetivo ao estudo.

2. Local do estudo

O estudo foi elaborado nas instalações do Instituto Universitário Egas Moniz no Laboratório de Biomateriais do Instituto Universitário Egas Moniz.

A análise dos espécimes, pela Microscopia Eletrónica de Varrimento, foi efetuada no MicroLab, Laboratório de Microscopia Eletrónica no Instituto Superior Técnico da Universidade de Lisboa.

3. Considerações éticas

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para a Saúde Egas Moniz, permitindo assim o uso de dentes do banco de dentes da Clínica Universitária Egas Moniz.

4. Seleção da amostra

Aleatoriamente, foram selecionados 12 molares conforme os seguintes critérios de inclusão: dente hígido, inexistência de lesões de cárie e de fracturas de esmalte, e sem tratamento prévio com agentes químicos ou mecânicos. A amostragem foi colocada em cloramina durante 6 dias e posteriormente colocada em água desionizada até ao momento da sua utilização.

Os dentes foram observados com uma lupa esteromicroscópica LeicaTM MZ6 (Leica, Germany), para a deteção de qualquer critério de exclusão.

5. Preparação da amostra

Toda a amostragem passou por uma limpeza a nível radicular com curetas de gracey 5/6, de forma a remover todos os resíduos de tecido mole, nomeadamente ligamento periodontal (Jo et al., 2014). De seguida, cada dente foi seccionado em 4 espécimes recorrendo ao micrótomo de tecidos duros (Accutom-50 - Struers A/S, Ballerup, Dinamarca) (Fig. 2)



Figura 2 – Micrótopo de tecidos duros Accutom-50

Em primeiro lugar foi feito um corte no sentido méso-distal a nível do sulco central do dente, obtendo-se 2 espécimes. Em segundo lugar, os 2 espécimes obtidos foram submetidos a 3 cortes no sentido ocluso-cervical de 3mm de largura de forma a obter 2 espécimes de cada um previamente obtido (4 no total). Em terceiro lugar foram seccionadas as raízes a nível da junção amelocimentária e foi feito um corte 4 mm acima da mesma, obtendo-se assim 4 espécimes 3mm/4mm. Com este procedimento realizado em toda a amostragem obtiveram-se os 48 espécimes.

6. Polimento da amostra

Toda a amostragem passa por um polimento através da máquina LaboPol-4[®] (WS Struers 18-B, Dinamarca) (Fig. 3) com discos de carbetto de sílica de 1200 gritts, com arrefecimento com água (Oliveira et al., 2014), apresentando no final uma face polida e lisa. Apenas a amostragem que será analisada pelo teste de microdureza de Vickers, passa pelo polimento.



Figura 3 – Máquina de Polimento LaboPol-4®

7. Simulação das lesões artificiais de *white spot*

Após a amostragem estar preparada, foram simuladas lesões de *white spot* através da desmineralização com ácido láctico. Todos os espécimes passam por um tratamento em 30 mL de solução contendo 50 mM de ácido láctico, 3 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 3 mM KH_2PO_4 , 6 mM de tetraetil metil difosfonato e vestígios de timol durante 6 dias (Cardoso et al., 2016) (Fig. 4). Durante esses 6 dias o recipiente é conservado numa estufa (Memmert INE 400, Memmert, Alemanha) (Fig. 5) a 37°C (Featherstone & Rodgers, 1981). Relativamente ao uso do ácido láctico, este foi o selecionado devido a este ser o resultado da metabolização dos hidratos de carbono feita pelas bactérias principais associadas à cárie como *Streptococcus mutans* (Wang et al., 2018).

8. Aleatorização das amostras e aplicação de CPP-ACP e ICON®

Em seguida à simulação de lesões de *white spot*, os 48 espécimes foram tratados com um remineralizante de caseína fosfopeptídea com fosfato de cálcio amorfo (CPP-ACP) durante 4 semanas, todos os dias, uma vez por dia durante 3 minutos (Mehta, Nandlal, & Prashanth, 2013).



Figura 4 - Ácido Láctico



Figura 5 - Estufa Memmert INE 400, (Mettmert, Alemanha)

O CPP-ACP (GC *Tooth Mousse*, *Recaldent™*, GC Europe, lote:250241F, validade: 08/2018) foi aplicado com um *microbrush* sobre a face previamente polida de cada espécime e colocado na estufa durante o tempo de tratamento. Após os 3 minutos o CPP-ACP foi removido os excessos com o *microbrush* e por diluição na saliva artificial. Após cada aplicação a amostra foi colocada em 50 mL de saliva artificial com a seguinte composição (100 ml): 3 g de sorbitol, 0,12g de KCl (cloreto de potássio), 0,08 g de NaCl

(cloreto de sódio), 0,006 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (cloreto de magnésio hidratado), 0,014 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (cloreto de cálcio hidratado), 0,0242 g de K_2HPO_4 (hidrofosfato de potássio), 0,32g de carboximetilcelulose de baixa viscosidade, 2 gotas de essência de menta, água destilada até perfazer 100 ml, pH 6,8-7,0 (Fig. 6).



Figura 6 - Saliva artificial

Decorridas as 4 semanas, a amostra foi dividida em 4 grupos de 12 espécimes, aleatoriamente: Grupos A, B, C e D.

Grupo A – Grupo controlo

Os 12 espécimes após tratamento remineralizante com CPP-ACP (Fig. 7) foram divididos em dois grupos, aleatoriamente, um de 10 espécimes que passou por teste de microdureza de Vickers (*Vickers Hardness Tester* – HSV-30T, Shimadzu Corporation, Japão), e um grupo de 2 espécimes que foi observado no MEV. Este grupo de controlo não passa por mais nenhum tratamento.



Figura 7- CPP-ACP – GC Tooth Mousse, *Recaldent™*

Grupo B – Grupo ICON 2 minutos

Os 12 espécimes deste grupo foram tratados com resinas infiltrantes (ICON ®, DMG Chemisch-Pharmazeutische Fabrik GmbH, Hamburg, Alemanha)(Fig. 8), segundo o seguinte protocolo (segundo o fabricante):

1. Foi limpa a superfície a tratar;
2. Foi usada a seringa IconEtch, que consiste em ácido clorídrico, ácido silícico pirogénico e substâncias de reação ativa, durante 2 minutos;
3. Procedeu-se à lavagem com água durante 30 segundos e secagem posterior com ar;
4. Foi usada a seringa de IconDry, que consiste em etanol a 99%, e deixou-se atuar durante 30 segundos. Secou-se posteriormente;
5. Foi usada a seringa de IconInfiltrant durante 3 minutos, fora de luz direta;
6. Foi fotopolimerizada durante 40 segundos;
7. Repetiu-se a microinfiltração com a seringa IconInfiltrant durante 1 minuto;
8. Foi fotopolimerizada durante 40 segundos.



Figura 8 - Seringa de ICON®

Grupo C – Grupo ICON 3 minutos

Os 12 espécimes deste grupo foram tratados com resinas infiltrantes (ICON ®, DMG Chemisch-Pharmazeutische Fabrik GmbH, Hamburg, Alemanha), segundo o seguinte protocolo:

1. Foi limpa a superfície a tratar;
2. Foi usada a seringa IconEtch, que consiste em ácido clorídrico, ácido silícico pirogénico e substâncias de reação ativa, durante 3 minutos;
3. Procedeu-se à lavagem com água durante 30 segundos e secagem posterior com ar;
4. Foi usada a seringa de IconDry, que consiste em etanol a 99%, e deixou-se atuar durante 30 segundos. Secou-se posteriormente;
5. Foi usada a seringa de IconInfiltrant durante 3 minutos, fora de luz direta;
6. Foi fotopolimerizada durante 40 segundos;
7. Repetiu-se a microinfiltração com a seringa IconInfiltrant durante 1 minuto;
8. Foi fotopolimerizada durante 40 segundos.

Grupo D – Grupo ICON 4 minutos

Os 12 espécimes deste grupo foram tratados com resinas infiltrantes (ICON®, DMG Chemisch-Pharmazeutische Fabrik GmbH, Hamburg, Alemanha), segundo o seguinte protocolo:

1. Foi limpa a superfície a tratar;
2. Foi usada a seringa IconEtch, que consiste em ácido clorídrico, ácido silícico pirogénico e substâncias de reação ativa, durante 4 minutos;
3. Procedeu-se à lavagem com água durante 30 segundos e secagem posterior com ar;
4. Foi usada a seringa de IconDry, que consiste em etanol a 99%, e deixou-se atuar durante 30 segundos. Secou-se posteriormente;
5. Foi usada a seringa de IconInfiltrant durante 3 minutos, fora de luz direta;
6. Foi fotopolimerizada durante 40 segundos;
7. Foi repetida a microinfiltração com a seringa IconInfiltrant durante 1 minuto;
8. Foi fotopolimerizada durante 40 segundos.

9. Análise da superfície preparada

9.1. Teste de microdureza de Vickers

Após a preparação das amostras foram, os 10 espécimes de cada grupo (de A a D) que foram polidos, observados sobre a análise de microdureza de Vickers (HSV-30T, Shimadzu Corporation, Japão) (Fig. 9). Foram realizadas 5 indentações (Fig. 10) em cada espécime a uma carga de 4,903N durante 15 segundos, as indentações foram feitas em diferentes zonas da superfície preparada de forma a ter uma perspetiva o mais próximo da realidade. Os resultados apresentam-se em HV, unidade de medida do teste executado.

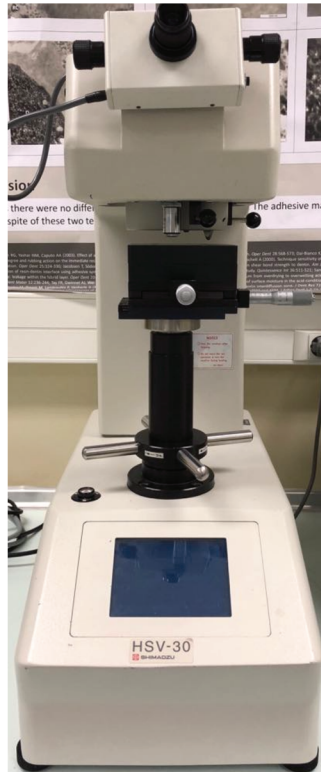


Figura 9 – Teste de microdureza de Vickers.

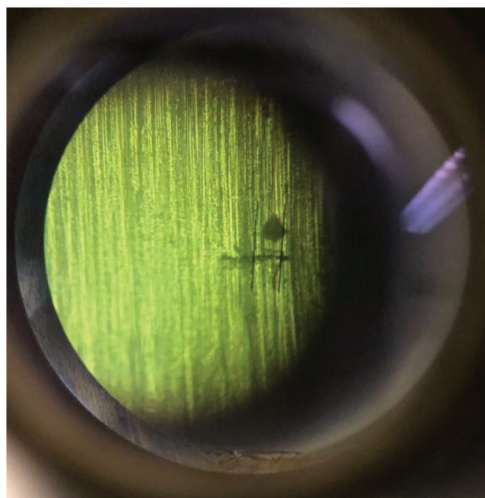


Figura 10 – Exemplo de Indentação do teste de microdureza de Vickers.

9.2. Microscópio eletrónico de varrimento

Após preparação da amostra 2 espécimes de cada grupo (de A a D), que não foram polidos, foram observados ao microscópio eletrónico de varrimento (JEOL JSM-700001F) (Fig. 11). A amostra foi preparada sobre uma placa de alumínio onde foi recoberta com uma liga metálica de ouro-paládio a 20 mA e 1,4 kV e colocada num

revestidor de bombardeamento iónico (*Quorum Technologies Q150T ES*, Reino Unido) (Fig. 12), de forma a desidratar os fragmentos em vácuo. Após a desidratação foi possível observar a amostra através do microscópio com várias ampliações.

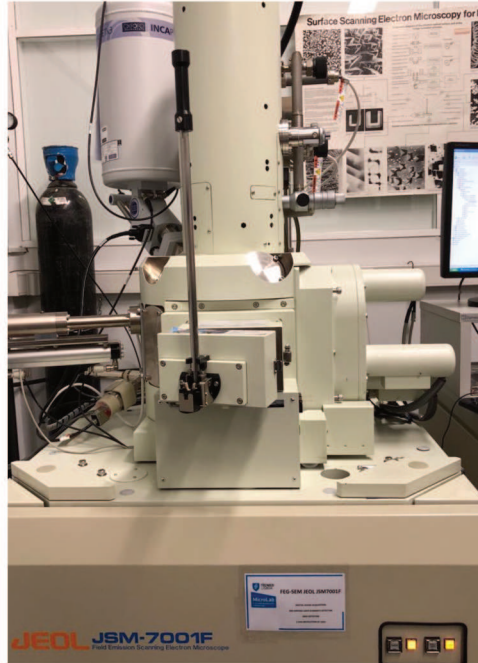


Figura 11 – Microscópio Eletrónico de Varrimento (JEOL JSM-700001F).



Figura 12 - Metalização dos espécimes no Quorum Technologies modelo Q150T ES.

9.3 Análise Estatística

Após recolha dos dados resultantes do teste de microdureza de Vickers, os dados foram tratados estatisticamente utilizando ao software IBM® SPSS®, *Statistical Package for Social Sciences*, versão 24.0, para *Microsoft Windows*.

III. RESULTADOS

1. Teste de Microdureza de Vickers

Na tabela seguinte (tabela 1) estão representadas as medidas descritivas do teste de microdureza, nomeadamente a média de resultados, o desvio-padrão, o erro padrão, o valor máximo e o valor mínimo de cada grupo. O número de cada espécime utilizados em cada grupo foi representado pela letra N.

O grupo A, correspondente aos espécimes submetidos apenas ao pré-tratamento com CPP-ACP, apresentou o valor de microdureza média mais elevado de $288,66 \pm 4,89$ HV.

O grupo B, correspondente aos espécimes submetidos ao pré-tratamento com CPP-ACP e protocolo de ataque ácido de 2 minutos na aplicação do ICON[®], apresentou um valor de microdureza médio de $278,14 \pm 12,85$ HV.

O grupo C, correspondente aos espécimes submetidos ao pré-tratamento com CPP-ACP e protocolo de ataque ácido de 3 minutos na aplicação do ICON[®], apresentou um valor de microdureza médio de $253,72 \pm 6,55$ HV.

O grupo D, correspondente aos espécimes submetidos ao pré-tratamento com CPP-ACP e protocolo de ataque ácido de 4 minutos na aplicação do ICON[®], apresentou um valor de microdureza médio de $249,58 \pm 9,74$ HV.

Tabela 1 – Medidas descritivas dos respetivos grupos.

	N	Microdureza Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo de confiança de 95% para média		Mínimo	Máximo
					Limite inferior	Limite superior		
Grupo A	10	288,660	4,8909	1,5466	285,161	292,159	281,4	297,4
Grupo B	10	278,140	12,8454	4,0621	268,951	287,329	256,2	291,2
Grupo C	10	253,720	6,5545	2,0727	249,031	258,409	243,6	264,4
Grupo D	10	249,580	9,7422	3,0808	242,611	256,549	239,8	267,0
Total	40	267,525	18,7157	2,9592	261,539	273,511	239,8	297,4

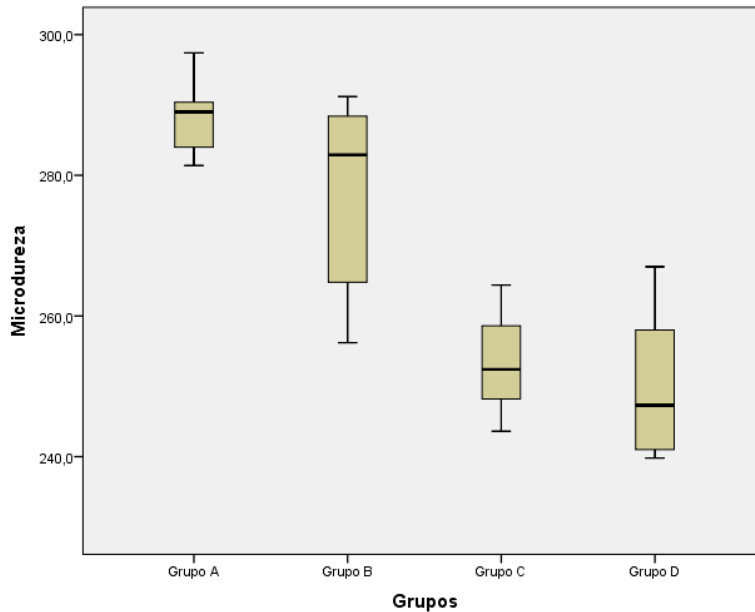


Figura 13 – Diagrama representativo da variância de valores obtidos em cada grupo.

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente recorrendo ao teste paramétrico ANOVA a um fator, para 4 amostras independentes, tendo-se assegurado previamente os pressupostos da independência dos grupos (i), da distribuição normal das amostras de cada grupo (ii) e da homogeneidade das variâncias dos vários grupos (iii).

- (i) A independência foi assegurada pela aleatorização da distribuição das amostras.
- (ii) Para avaliar a normalidade das amostras foi aplicado o teste Shapiro-Wilk para um nível de significância de 5%, tendo-se confirmado que $p > 0,05$ para todos os grupos (tabela 2). Os resultados obtidos mostram que as amostras são normais.

Tabela 2 – Resultados do teste de Normalidade de Shapiro-Wilk.

Testes de Normalidade

	Grupos	Shapiro-Wilk Estatística	gl	Sig.
Microdureza Média	Grupo A	,967	10	,864
	Grupo B	,855	10	,066
	Grupo C	,975	10	,931
	Grupo D	,888	10	,161

*. Este é um limite inferior da significância verdadeira.

a. Correlação de Significância de Lilliefors

- (i) A homogeneidade das variâncias foi avaliada pelo teste de Levene, o qual revelou que as variâncias diferem significativamente entre grupos ($p=0,007$),

ou seja, não são homogêneas (tabela 3). De facto, na figura 13 é possível visualizar variâncias superiores nos grupos B e D, em relação às dos grupos A e C. Embora este pressuposto do teste ANOVA não tenha sido verificado, o facto da dimensão dos vários grupos ter igual ($N=10$) permitiu a aplicação daquele teste paramétrico. No entanto, os resultados obtidos foram sempre confrontados com os de outros testes alternativos, não paramétricos (resultados não apresentados).

Tabela 3 – Teste de Homogeneidade de Variâncias de Levene.

Teste de Homogeneidade de Variâncias			
Microdureza Média			
Estatística de Levene	gl1	gl2	Sig.
4,674	3	36	,007

O teste ANOVA a um fator foi aplicado aos quatro grupos de estudo, para um intervalo de confiança de 95%, considerando-se as seguintes hipóteses de estudo:

- H_0 : As médias dos grupos não diferem estatisticamente.
- H_1 : As médias dos grupos diferem estatisticamente.

Tabela 4 - Resultados do teste paramétrico ANOVA a um fator aplicado aos grupos de trabalho A-D, considerando IC=95%

ANOVA					
Microdureza Média					
	Soma dos Quadrados	gl	Quadrado Médio	F	Sig.
Entre Grupos	10719,675	3	3573,225	43,736	,000
Nos grupos	2941,180	36	81,699		
Total	13660,855	39			

O teste ANOVA a um fator, em que $F(3,36)=43,736$ mostra uma significância de 0,001 ($p<0,05$), revelando existirem diferenças na microdureza média entre grupos. Rejeitou-se a hipótese nula e aceitou-se a hipótese alternativa.

Para comparação múltipla da média dos grupos aplicou-se o teste de Games-Howell (teste *post-hoc*), que compara as médias de todos os pares de grupos envolvidos no estudo, por ser o mais adequado a grupos de pequena dimensão que diferem significativamente nos valores de variância. Os resultados obtidos por este teste encontram-se representados na tabela 5. Na figura 14 estão representados os valores médios de cada grupo.

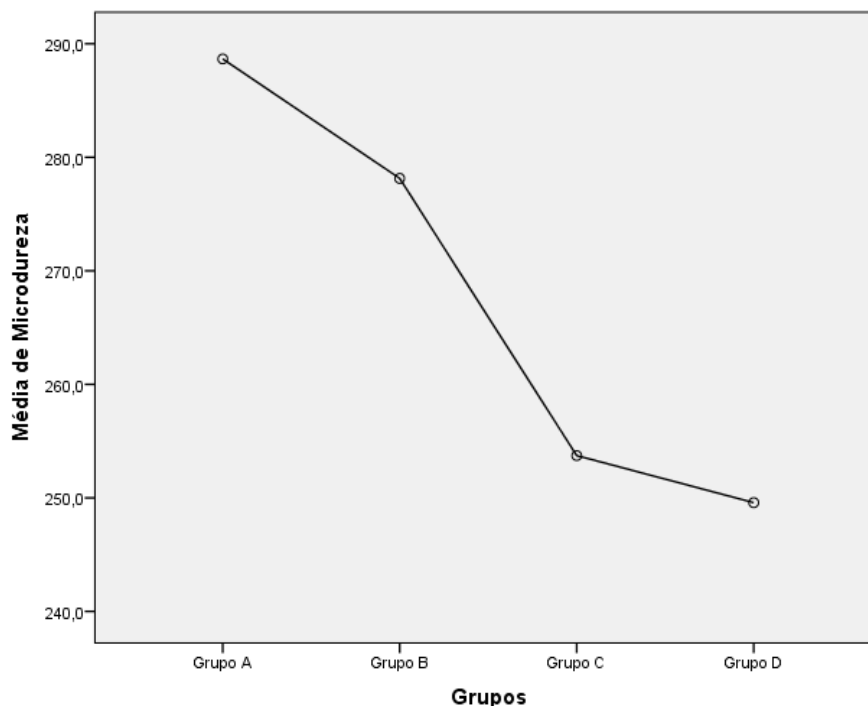


Figura 14 – Representação gráfica dos valores médios obtidos de cada grupo.

Tabela 5 – Teste de Gomes-Howell

Comparações múltiplas

Variável dependente: Microdureza
Games-Howell

(I) Grupos	(J) Grupos	Diferença média (I-J)	Erro Padrão	Sig.	Intervalo de Confiança 95%	
					Limite inferior	Limite superior
Grupo A	Grupo B	10,5200	4,3466	,128	-2,459	23,499
	Grupo C	34,9400*	2,5862	,000	27,573	42,307
	Grupo D	39,0800*	3,4472	,000	28,990	49,170
Grupo B	Grupo C	24,4200*	4,5603	,001	11,088	37,752
	Grupo D	28,5600*	5,0982	,000	14,048	43,072
Grupo C	Grupo D	4,1400	3,7131	,686	-6,501	14,781

*. A diferença média é significativa no nível 0.05.

Os resultados indicam que, para um intervalo de confiança de 95%:

- As médias do Grupo A e do Grupo B não diferem significativamente ($p=0,128$), ou seja, a média do Grupo A é estatisticamente idêntica à média do Grupo B.
- As médias do Grupo C e do Grupo D não diferem significativamente ($p=0,686$), ou seja, a média do Grupo C é estatisticamente idêntica à média do Grupo D.
- As médias dos grupos B e C diferem estatisticamente ($p=0,001$).

2. Microscópio eletrônico de varrimento

De cada grupo foram selecionados 2 espécimes que foram submetidos a análise de microscopia eletrônica de varrimento com ampliações de 1000x, 5000x, 10000x. As imagens selecionadas dessa análise são as seguintes (Fig. 15 a Fig. 27):

Grupo A

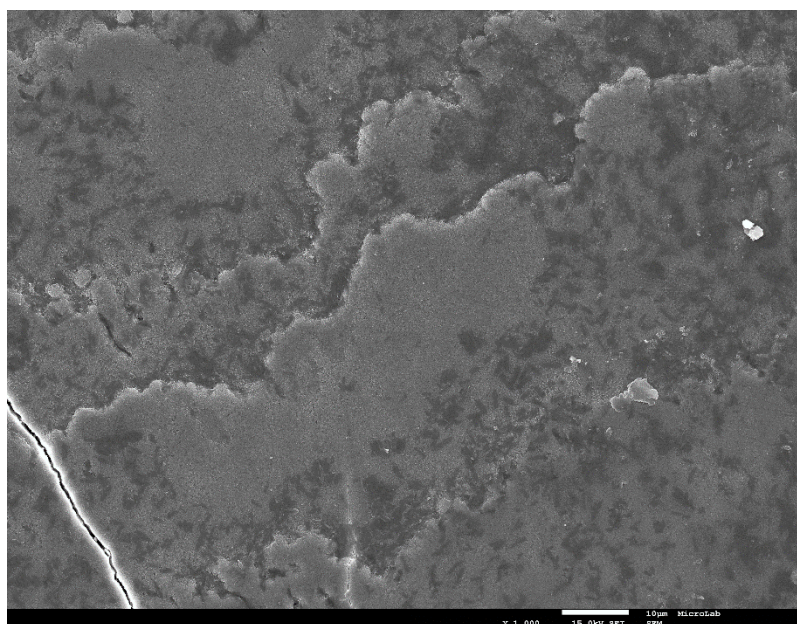


Figura 15 – A1. Visão panorâmica sobre a superfície de esmalte a x1000 após indução artificial de *white spot* e remineralização com CPP-ACP. Observam-se fraturas de tensão por desidratação.

Qual o timing de ataque ácido numa resina infiltrante de esmalte, após remineralização com CPP-ACP?

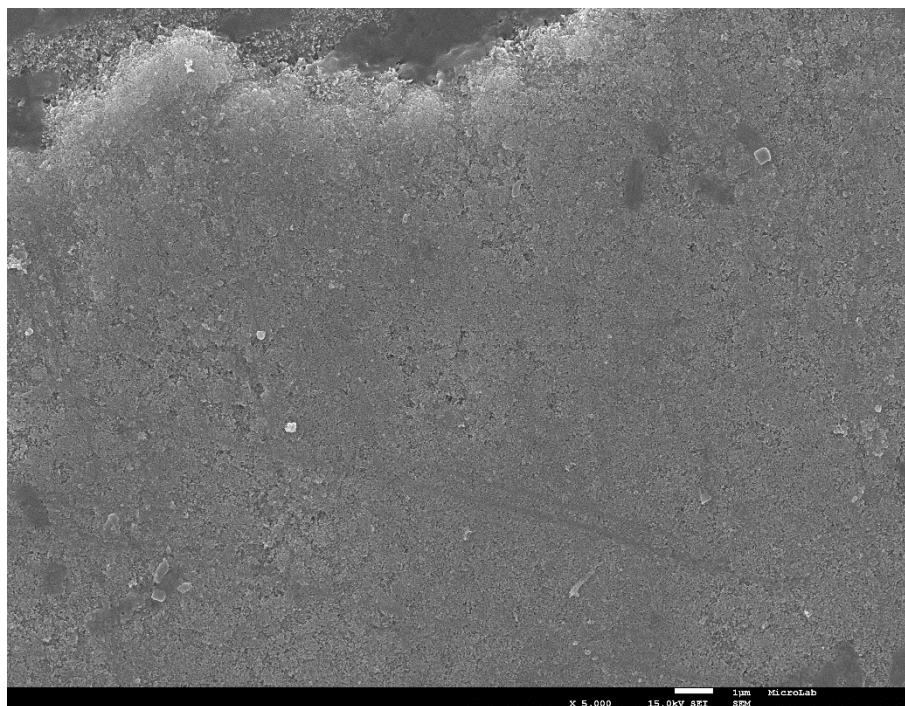


Figura 16 – A1. Visão panorâmica sobre a superfície de esmalte a x5000 após indução artificial de *white spot* e remineralização com CPP-ACP.

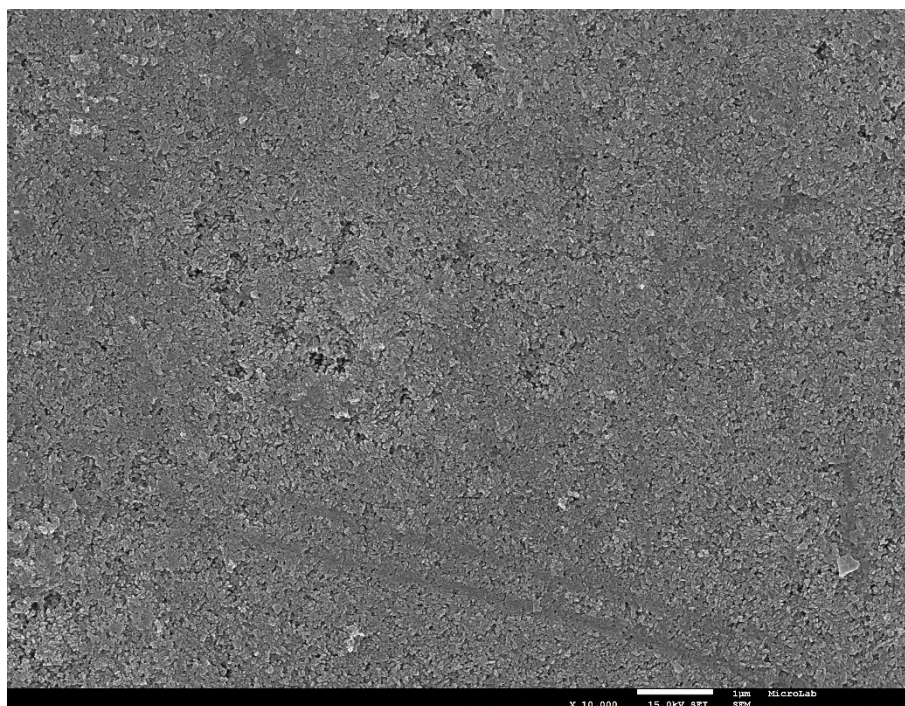


Figura 17 – A1. Visão panorâmica sobre a superfície de esmalte a x10000 após indução artificial de *white spot* e remineralização com CPP-ACP. Começam a ser evidente as lacunas na camada de esmalte.

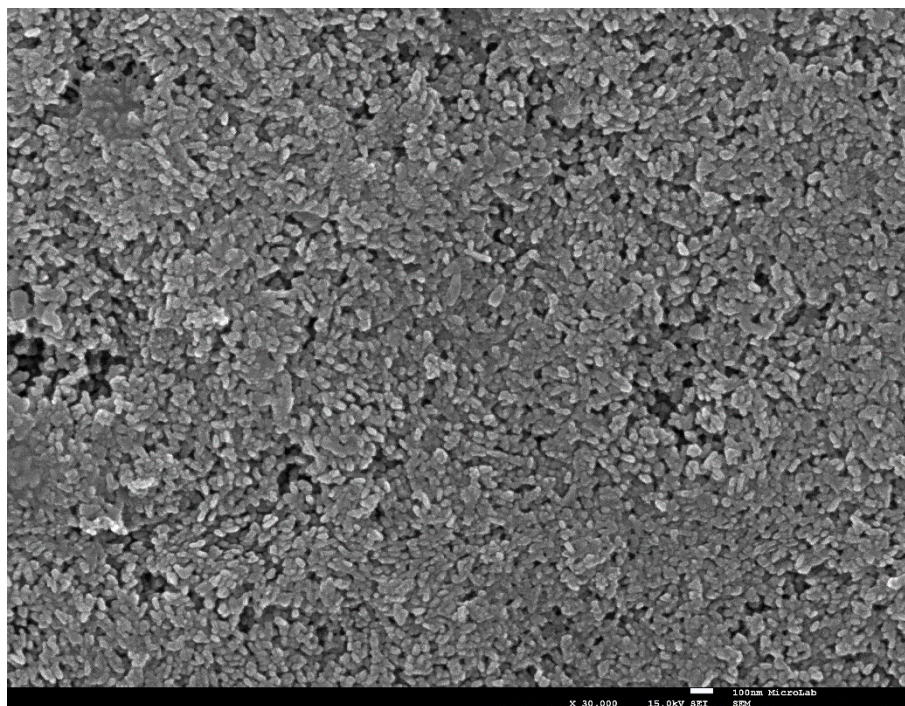


Figura 18 – A1. Visão panorâmica sobre a superfície de esmalte a x30000 após indução artificial de *white spot* e tratamento com CPP-ACP. É visível as zonas em que existem falhas na estrutura cristalina do esmalte devido à desmineralização induzida e outras compensadas pelo complexo.

Grupo B

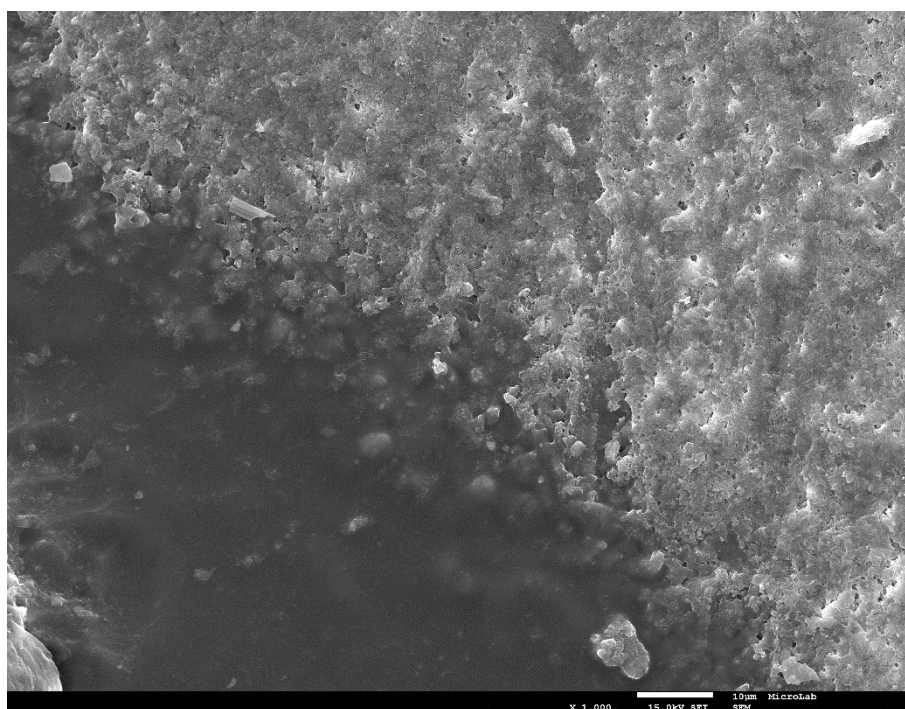


Figura 19 – B1 - Visão panorâmica sobre a transição da superfície de esmalte a x1000 após indução artificial de *white spot*, tratamento com CPP-ACP e resina infiltrante e a zona de esmalte sem resina. Consegue-se observar a zona em que o esmalte não foi tratado com resina pois encontra-se mais heterogêneo e os primas mais visíveis.

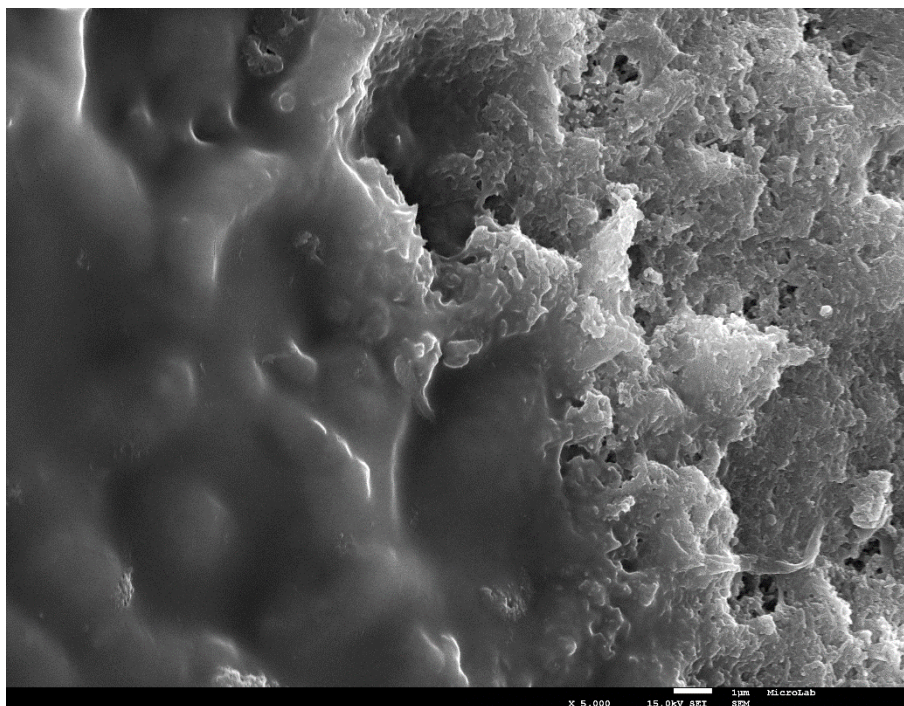


Figura 20 – B1 - Visão panorâmica sobre a transição da superfície de esmalte a x5000 após indução artificial de *white spot*, tratamento com CPP-ACP e resina infiltrante e a zona de esmalte sem resina. É de notar a obturação das lacunas de esmalte pela resina infiltrante

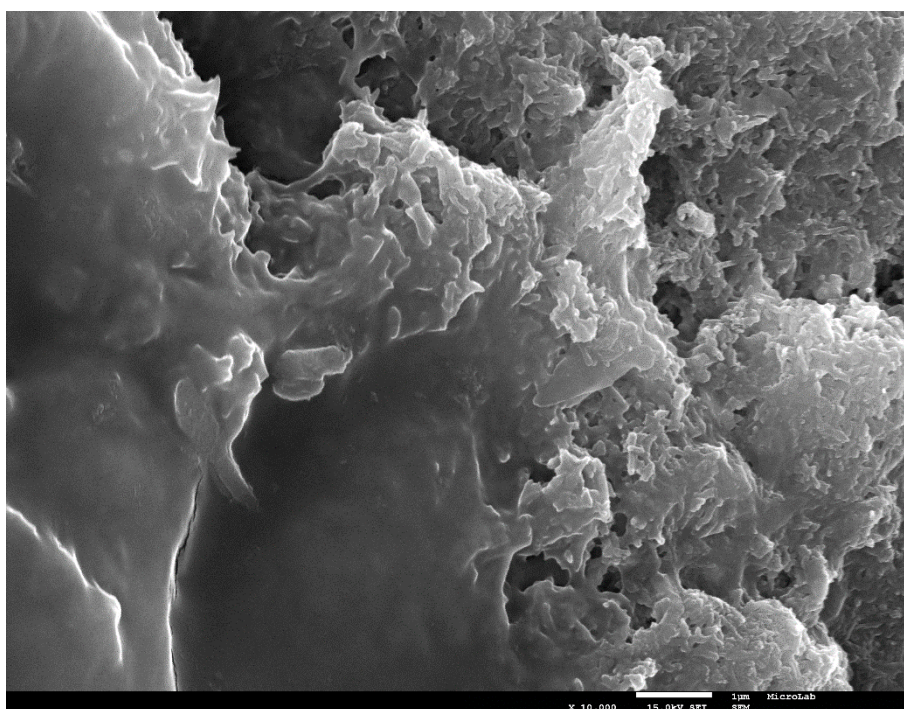


Figura 21 – B1 - Visão panorâmica sobre a transição da superfície de esmalte a x10000 após indução artificial de *white spot*, tratamento com CPP-ACP e resina infiltrante e a zona de esmalte sem resina. É de notar a obturação das lacunas de esmalte pela resina infiltrante.

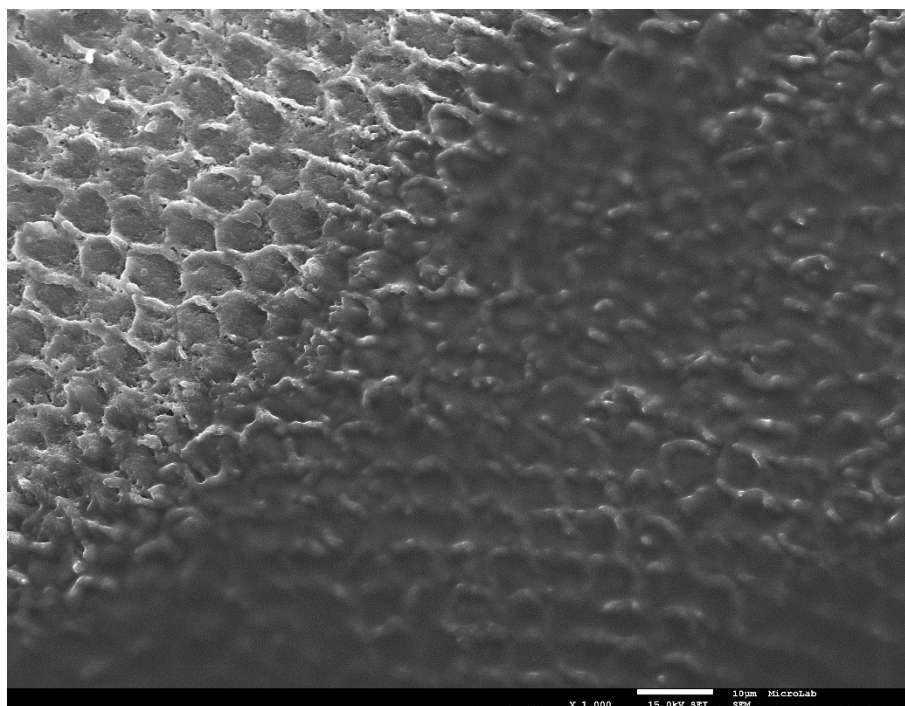
Grupo C

Figura 22 – C1 - Visão panorâmica sobre a transição da superfície de esmalte a x1000 após indução artificial de *white spot*, tratamento com CPP-ACP e resina infiltrante (protocolo de 3 minutos de condicionamento ácido) e a zona de esmalte sem resina. De notar que existe uma desmineralização maior atendendo a lacunas de maior diâmetro observando-se o efeito de “favo de mel”.

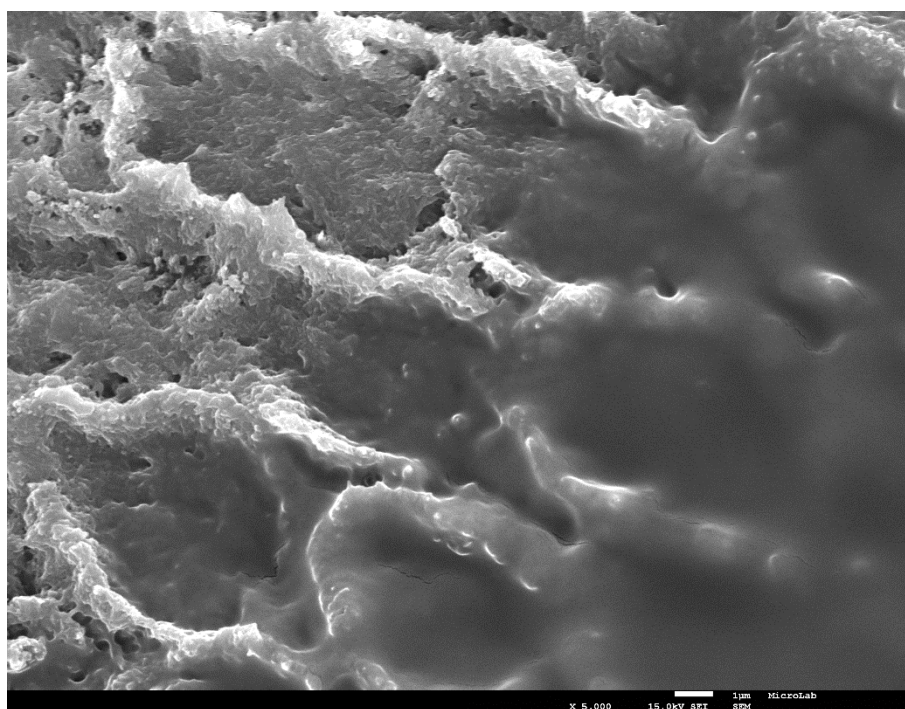


Figura 23 – C1 - Visão panorâmica sobre a transição da superfície de esmalte a x5000 após indução artificial de *white spot*, tratamento com CPP-ACP e resina infiltrante e a zona de esmalte sem resina. Os prismas de esmalte ficam cobertos pela resina quer na superfície quer no seu preenchimento.

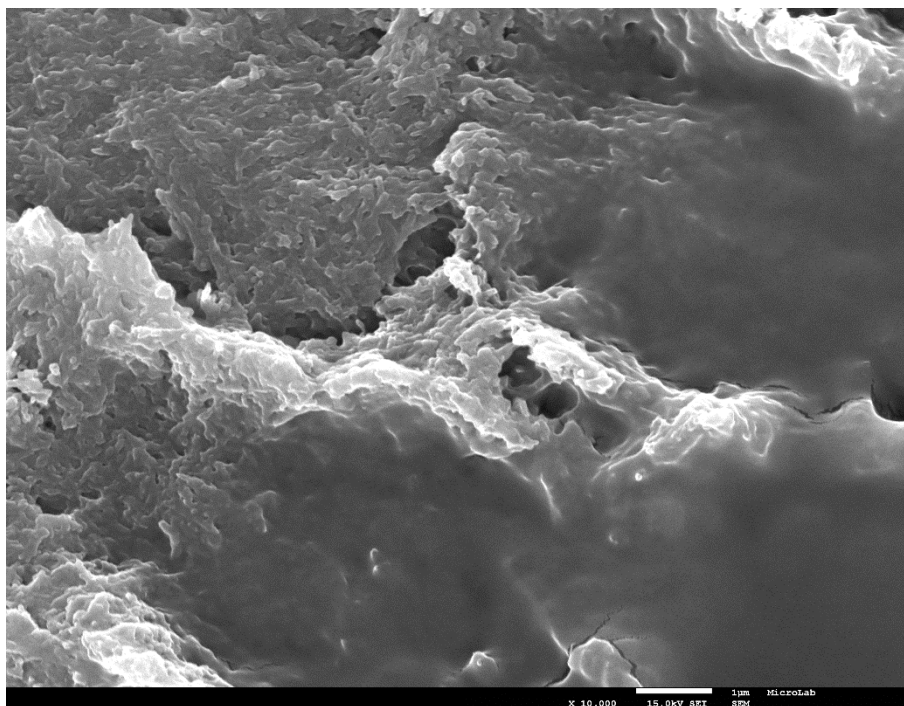


Figura 24 – C1- Visão panorâmica sobre a transição da superfície de esmalte a x10000 após indução artificial de *white spot*, tratamento com CPP-ACP e resina infiltrante e a zona de esmalte sem resina.

Grupo D

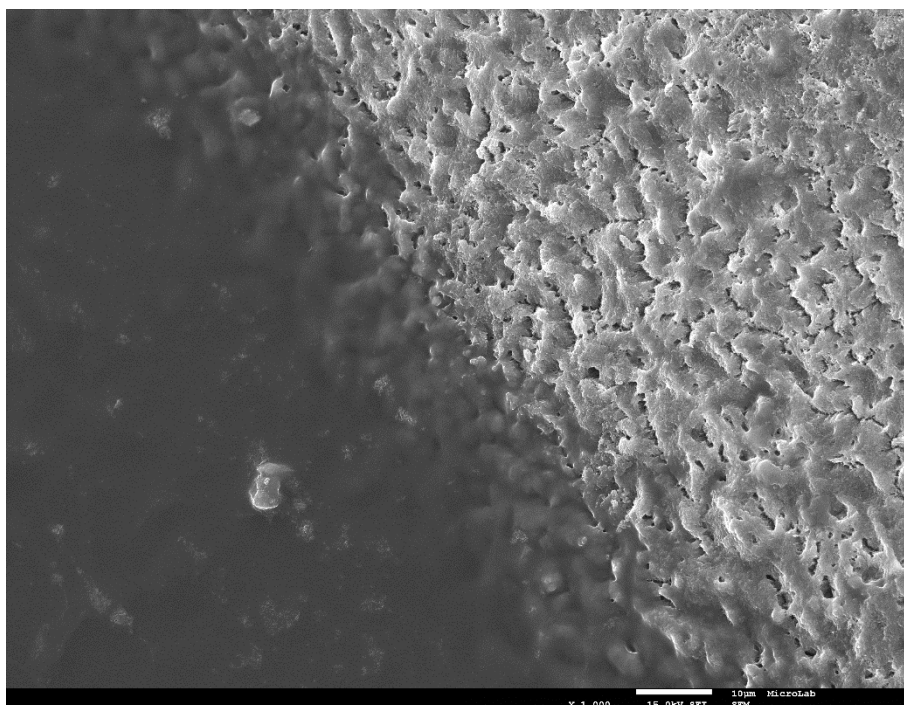


Figura 25 – D1 - Visão panorâmica sobre a transição da superfície de esmalte a x1000 após indução artificial de *white spot*, tratamento com CPP-ACP e resina infiltrante (protocolo de 4 minutos de condicionamento ácido) e a zona de esmalte sem resina.

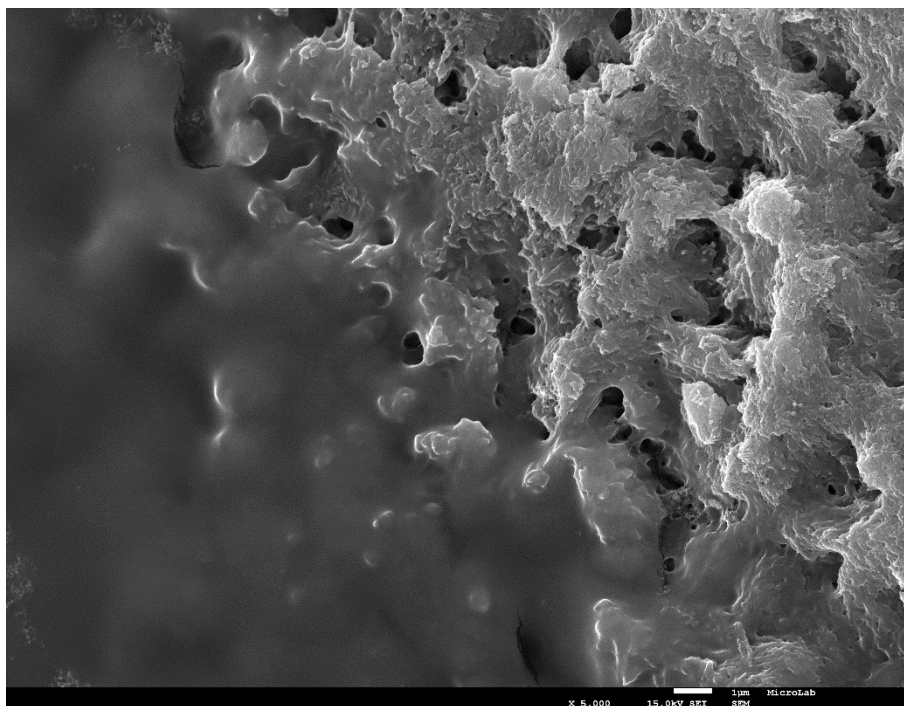


Figura 26 – D1 - Visão panorâmica sobre a transição da superfície de esmalte a x5000 após indução artificial de *white spot*, tratamento com CPP-ACP e resina infiltrante e a zona de esmalte sem resina com mais espaços lacunares.

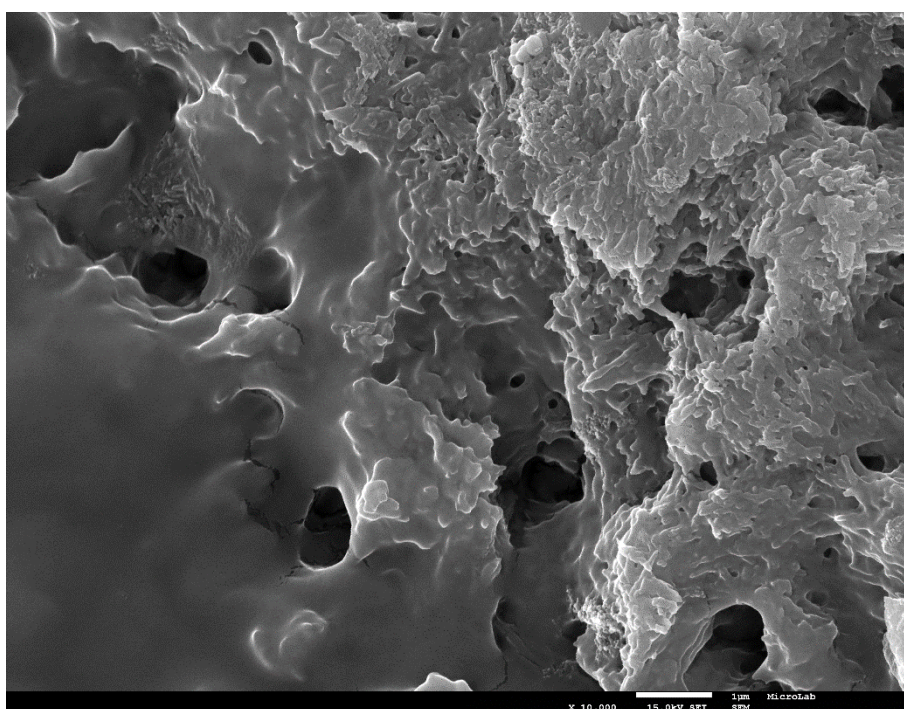
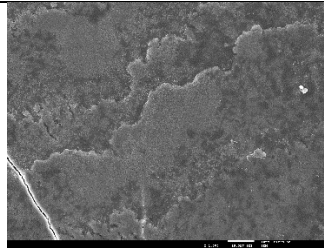
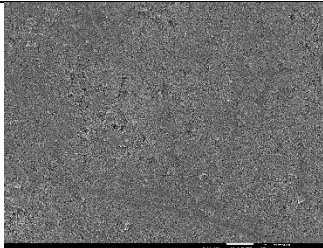
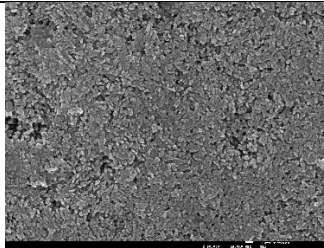

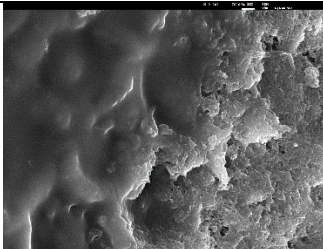
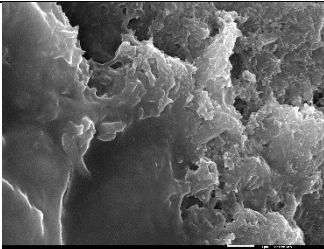
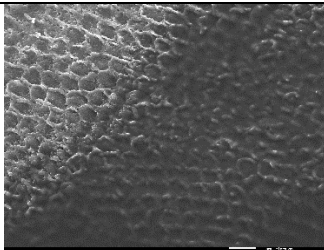
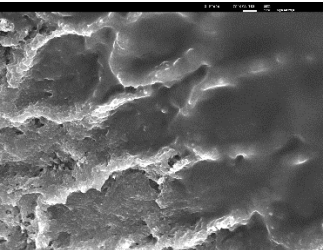
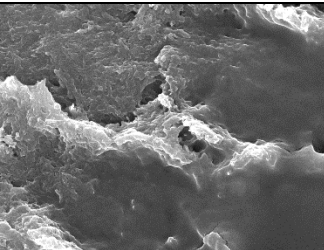

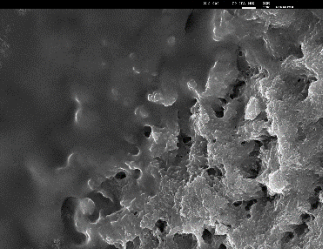
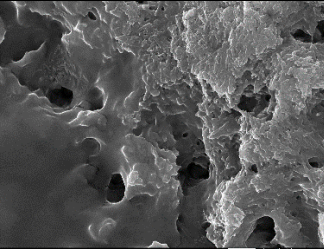


Figura 27 – D1 - Visão panorâmica sobre a transição da superfície de esmalte a x10000 após indução artificial de *white spot*, tratamento com CPP-ACP e resina infiltrante e a zona de esmalte sem resina com mais espaços lacunares. Observa-se maior desorganização cristalina

Qual o timing de ataque ácido numa resina infiltrante de esmalte, após remineralização com CPP-ACP?

Tabela 6 - Somatório das imagens de análise do microscópio eletrónico de varrimento dos diversos grupos.

Grupo A (x1000, x10000, x30000)		
		
Grupo B (x1000, x5000, x10000)		
		
Grupo C (x1000, x5000, x10000)		
		
Grupo D (x1000, x5000, x10000)		
		

IV. DISCUSSÃO

Como primeira linha no tratamento de lesões de cárie não cavitadas estão os tratamentos não invasivos como os diversos agentes de remineralização. No entanto, existe também a opção terapêutica minimamente invasiva das resinas infiltrantes, que penetram as microporosidades por capilaridade (Gurdogan, Ozdemir-Ozenen, & Sandalli, 2017).

A lesão de *white spot* é a primeira evidência visível de cárie no esmalte, caracterizada por uma lesão desmineralizada sob uma superfície intacta. São provocadas devido às condições acídicas consequentes da metabolização bacteriana dos hidratos de carbono da dieta, resultando num desequilíbrio entre a desmineralização e remineralização do esmalte, que torna o mesmo mais poroso, mais suscetíveis à progressão da cárie e as suas propriedades mecânicas são afetadas (Abdullah & John, 2016).

Tendo em conta que o 1º passo será sempre uma abordagem a favor da remineralização, todos os grupos deste estudo passaram por um pré-tratamento com CPP-ACP, que apresenta elevada evidência como agente remineralizante e um papel ativo na reversão de *white spots*.

Como objetivo principal deste estudo, temos a comparação de *timings* de ataque ácido do tratamento com resina infiltrante ICON®, e perceber as suas consequências quer nas propriedades mecânicas (teste de microdureza de Vickers) quer no aspeto microscópico (avaliado pelo MEV). Serviu como grupo controlo aquele que apenas passou pelo pré-tratamento com CPP-ACP.

1. Teste de Microdureza de Vickers

A indução artificial de *white spot*, de forma a simular as lesões foi feita através do ácido láctico, que tem sido utilizada em estudos *in vitro* tendo em conta o seu papel principal como metabolito da placa bacteriana na cavidade oral levando à formação de cáries (Featherstone & Rodgers, 1981). O ácido láctico induz desmineralização na amostra, perdendo conteúdo mineral e por isso diminui a microdureza da mesma.

Após desmineralização procura-se que ocorra reposição mineral pelo papel remineralizante da saliva, saturada em cálcio e fosfato, que ocupam as lacunas criadas nos cristais de esmalte, e desaceleram o processo de desmineralização provocado (Hara & Zero, 2014). Por estas razões a amostra foi colocada em saliva artificial após indução artificial de *white spot*.

Estudos que comparam o potencial de remineralização da saliva com o do CPP-ACP demonstram que a saliva não é tão eficaz como o do complexo de CPP-ACP, e este tem ainda uma ação mais rápida num momento potencialmente desmineralizante (Elkassas & Arafa, 2014).

Vários estudos comprovam que o uso de CPP-ACP leva a um aumento substancial no conteúdo mineral do esmalte, tendo em conta este complexo conseguir manter um meio saturado com cálcio e fosfato, essenciais para compensar as perdas por desmineralização (Reema et al., 2014). O pré-tratamento de toda a amostra com este agente de remineralização durante 4 semanas, após a indução artificial de *white spot*, teve como objetivo repor o conteúdo mineral perdido e simular a terapêutica usual de uma agente remineralizante após diagnóstico de *white spot*.

O teste de microdureza de Vickers foi um dos métodos utilizados para a avaliação da superfície de esmalte da amostra, e foi utilizado de forma a aferir de forma indireta sobre o conteúdo mineral do esmalte tratado, e é uma forma simples, rápida e não destrutiva de o fazer (Rani et al., 2016).

O grupo A, que apenas passa pela fase de indução artificial de *white spot* e pela fase de pré-tratamento com CPP-ACP, demonstrou um valor médio de microdureza de Vickers de $288,66 \pm 4,89$ HV. Pode-se atribuir estes valores ao fato de durante 4 semanas, a amostra foi sujeita a tratamento com CPP-ACP durante 3 minutos por dia, sujeitando a amostra a um ambiente supersaturado em cálcio e fosfato, aumentando a taxa de remineralização (Reema et al., 2014). O grupo B, correspondente ao grupo com pré-tratamento com CPP-ACP e protocolo de ataque ácido de 2 minutos apresentou um valor médio de microdureza de Vickers de $278,14 \pm 12,85$ HV, estatisticamente semelhantes com o grupo A, o que se encontra em concordância com outros estudos, que demonstram que o pré-tratamento com CPP-ACP promove a remineralização e que as resinas

infiltrantes aumentam a microdureza da amostra, visto que vão ocupar os espaços porosos criados pela carência de mineral (Paris et al., 2013).

Estudos comparativos entre um grupo com pré-tratamento com CPP-ACP e posterior tratamento com resinas infiltrantes e um grupo sem pré-tratamento com CPP-ACP e apenas tratamento com resinas infiltrantes demonstram que o grupo com pré-tratamento com CPP-ACP apresenta valores mais elevados de microdureza de Vickers, novamente atribuindo estes valores ao fato de ocorrer remineralização na presença do agente remineralizante (Carretero, Manso, Carmo, Carvalho, Ascenso & Polido, 2017). Atualmente, as resinas infiltrantes estão indicadas para cessar a progressão das lesões não cavitadas de esmalte e, supostamente, estabilizar os poros da lesão e aumentar a microdureza comparativamente às lesões não tratadas (Paris et al., 2013). O objetivo destas resinas passa por obturar estas lesões incipientes com estrutura altamente porosa com resinas de baixa viscosidade. Esta técnica de resinas tem demonstrado capacidade de estabilização mecânica das lesões, de preservação de estrutura dentária saudável por ser uma abordagem minimamente invasiva, e de diminuir o risco de cáries secundárias (Prajapati et al., 2017).

Existe uma camada superficial de esmalte remineralizado sobre a lesão de *white spot*, que deve ser removida de forma a que a resina infiltrante consiga penetrar até às camadas mais profundas da lesão. Esta camada é conseguida não só pela remineralização da saliva, que se encontra em contacto constante com a lesão, como pelos os remineralizantes utilizados (Prajapati et al., 2017). No caso do presente estudo, o agente remineralizante utilizado foi o CPP-ACP.

Para remover esta camada foi utilizado um condicionamento ácido com 15% de HCl durante 2 minutos, indicado pelo fabricante. Para os 3 grupos B, C e D foram aplicados diferentes timings de ataque ácido, 2, 3 e 4 minutos, respetivamente.

De acordo com estudos prévios, a remoção da camada com 15% de HCl durante 2 minutos, consegue remover camadas com profundidades de 20 a 45 μ . Conjuntamente, foi demonstrado que o aumento do volume dos poros da camada superficial tem um papel importante na melhoria da eficácia da infiltração da resina (Yim, Min, Kwon, & Kim, 2014). Existem vários tipos de condicionamentos ácidos, no entanto, o condicionamento com ácido clorídrico é aquele que apresenta melhores resultados, conseguindo uma

remoção de 70 a 80% da camada superficial (Lausch, Paris, Selje, Dörfer, & Meyer-Lueckel, 2015; Meyer-Lueckel, Paris, & Kielbassa, 2007). Sendo assim o ataque ácido influencia diretamente a penetração da resina e será de esperar que influencie igualmente os valores de microdureza obtidos.

O grupo C, correspondente à amostra tratada com pré-tratamento com CPP-ACP e protocolo de ataque ácido de 3 minutos, apresentou um valor médio de microdureza de $253,72 \pm 6,55\text{HV}$, enquanto que o grupo D, correspondente à amostra tratada com pré-tratamento com CPP-ACP e protocolo de ataque ácido de 4 minutos, apresentou um valor médio de microdureza de $249,72 \pm 9,74\text{HV}$. Após análise estatística destes valores, chegou-se à conclusão que estes não diferem entre si estatisticamente. No entanto, os valores destes dois grupos (C e D) em comparação com os restantes grupos (A e B) difere estatisticamente. Os resultados obtidos demonstram diferenças na microdureza do esmalte quando se aplica condicionamento ácido superior a 2 minutos, que se encontra de acordo com outros estudos (Zafar & Ahmed, 2015).

Tendo em conta que o HCL remove os minerais da superfície do esmalte, é compreensível que um aumento no tempo de contacto entre o HCL e a superfície da lesão de *white spot*, leve a uma perda de mineral superior, tal como os resultados demonstram.

Foi utilizado álcool a 99% (conforme indicações do fabricante) de forma a remover a água que se possa ter alojado nas microporosidades do corpo da lesão de forma a permitir a infiltração por capilaridade do máximo de resina. Uma fraca desidratação da amostra leva a uma diminuição da penetração da resina e, consequentemente, a uma diminuição do sucesso do tratamento e aumenta o risco de cáries secundárias (Meyer-Lueckel & Paris, 2010).

Após desidratação da amostra foi aplicada a resina infiltrante, durante 3 minutos, e posteriormente foi fotopolimerizada durante 40 segundos. Em seguida foi aplicada durante 1 minuto adicional e foi fotopolimerizada durante mais 40 segundos, tal como as indicações do fabricante.

Estudos anteriores mostraram que, embora a técnica de infiltração de resina resulte em redução significativa da progressão da lesão em condições desmineralizantes, pode ocorrer alguma desmineralização após o tratamento com a mesma. Isto pode ser devido à

dissolução parcial do mineral remanescente no corpo da lesão que não foi completamente integrado na matriz da resina ou pela contração de polimerização da resina durante a fotopolimerização, o que resulta em infiltração da resina e consequente redução da resistência a futuros ataques ácidos (Torres et al., 2012).

Apesar disso, redução na microdureza após o processo de desmineralização, o grupo infiltrado com resina segundo o fabricante exibiu valores de microdureza semelhantes aos obtidos pelo grupo tratado apenas com CPP-ACP, tal como demonstrados em estudos anteriores (Torres et al., 2012; Carreteto, et al., 2017).

2. Microscópio eletrônico de varrimento

Com o auxílio da análise topográfica do microscópio eletrônico de varrimento consegue-se observar as consequências dos diferentes tratamentos utilizados na estrutura de esmalte da amostra (Prajapati et al., 2017).

Concluída a observação das amostras do estudo por MEV são observáveis diferenças morfológicas entre os diferentes grupos, quer quando o grupo é tratado apenas com CPP-ACP em comparação com o tratamento com resinas infiltrantes, quer entre os grupos que foram todos tratados com resinas infiltrantes mas com diferentes *timings* de condicionamento ácido. O grupo A em relação aos restantes grupos apresenta-se muito menos poroso e com maior organização dos cristais de esmalte. Entre os grupos tratados com as resinas infiltrantes (B-D) existe um aumento de porosidade crescente e também um aumento da desorganização dos cristais à medida que se aumentou o tempo de condicionamento ácido.

Nas imagens correspondentes ao grupo A (grupo controlo) em que a superfície sofreu indução artificial de *white spot* durante 6 dias com ácido láctico e posterior tratamento com CPP-ACP durante 4 semanas, consegue-se observar as consequências da desmineralização provocada pelo ácido, observando-se porosidades que se apresentam como lacunas na estrutura prismática do esmalte. No entanto, são observadas mais zonas em que as lacunas foram preenchidas pelo fosfato e cálcio fornecidos pelo CPP-ACP, observando-se uma superfície mais homogênea, compatível com imagens observadas em estudos prévios (Poggio, Lombardini, Vigorelli, & Ceci, 2013).

Nas imagens do grupo B, em que a amostra passou por pré-tratamento com CPP-ACP e tratamento com resinas infiltrantes com protocolo de condicionamento ácido de 2 minutos, consegue-se observar uma camada de transição entre a superfície tratada com resina infiltrante e a superfície que apenas foi tratada com CPP-ACP. Apresenta uma evidente dissolução parcial da camada superficial, após exposição ao condicionamento ácido. Isto pode indicar que não só o CPP-ACP não remineralizou toda a superfície, como o condicionamento ácido não removeu toda a camada superficial, não permitindo uma infiltração da resina ideal (Elkassas & Arafa, 2014)

No grupo C, em que após tratamento com CPP-ACP, o protocolo de condicionamento ácido foi de 3 minutos, e as imagens observadas demonstram uma desmineralização maior atendendo às lacunas de maior diâmetro, comparativamente ao grupo anterior, algo que pode ser consequente a uma exposição mais prolongada ao condicionamento ácido.

O processo de condicionamento ácido envolve, principalmente, a zona interior do prisma, criando uma estrutura em “favo de mel” (Poggio et al., 2013).

As imagens do grupo D, correspondente ao grupo que, após pré-tratamento com CPP-ACP, passou pelo condicionamento mais prolongado de 4 minutos, são aquelas que apresentam um aspeto mais heterogéneo, que com o aumento da ampliação é possível observar, apesar de não muito dispare, que os espaços lacunares são os maiores de toda a amostragem. Este aumento de diâmetro progressivo das lacunas ao longo dos grupos ($B < C < D$) deve-se à exposição também progressiva ao condicionamento ácido, levando por isso a maior desmineralização, observável pelas imagens do MEV.

Comparando resultados do teste de microdureza com as imagens observadas pelo MEV, é de notar que os grupos que apresentaram menores valores de microdureza são aqueles que a olho microscópico apresentaram maior heterogenia de superfície, bem como maiores diâmetros de lacunas prismáticas, e maior desorganização dos cristais provocada pela desmineralização, enquanto que o grupo com uma superfície mais homogénea (grupo A) apresentou os maiores valores de microdureza de Vickers.

3. Limitações do estudo

Existem limitações a nível deste estudo que passam pela sua natureza. O fato de ser um estudo *in vitro* é logo uma limitação em si mesmo. Simular as condições complexas da cavidade oral, bem como simular a dinâmica da cárie, são impossíveis e francamente difíceis de chegar perto. Desde a composição da saliva, às alterações constantes de temperatura na cavidade oral, às alterações de pH devido às mais diversas razões, levam a que os estudos *in vitro* sejam uma representação muito limitada da realidade.

Estas condições específicas da cavidade oral tentaram ser compensadas, usando saliva artificial e pela colocação da amostra numa estufa a 37°C. A saliva artificial não recria completamente as características biológicas da saliva natural.

As lesões de *white spot* tentaram ser simuladas usando ácido láctico, o metabolito principal da placa bacteriana que provoca cáries de esmalte. No entanto, a dinâmica desmineralização-remineralização é muito complexa e ocorre ao longo do tempo, enquanto que no presente estudo a desmineralização ocorreu durante 6 dias. A amostragem, apesar de ser de dentes humanos, é representativa apenas da face e porção do dente em causa, e o conteúdo mineral e a sua densidade de cristais variam ao longo do dente, pelo que a sua resposta aos tratamentos bem como aos testes não são iguais.

4. Perspetivas para futuros estudos

Em estudos futuros seria importante comparar grupos em que apenas é feita uma aplicação de resina (como o presente estudo), com grupos com uma segunda aplicação de resina, de forma a averiguar se existe um melhor preenchimento das lacunas da lesão. Seria igualmente interessante, ter um grupo controlo sem tratamento para comparar esta opção terapêutica no avanço de cáries em relação à ausência de tratamento. Em simultâneo, avaliar os resultados, utilizando novas técnicas de uso com o MEV, com técnica de corte perpendicular a face tratada e visualização da penetração da resina. Por fim, um estudo comparativo entre a aplicação do condicionamento ácido com ação apenas química (como nas indicações do fabricante) e uma ação química e mecânica.

Qual o timing de ataque ácido numa resina infiltrante de esmalte, após remineralização com CPP-ACP?

V. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos do estudo, e perante as limitações do mesmo, podemos tirar as seguintes conclusões:

- Após indução artificial de cárie e pré-tratamento com CPP-ACP, o esmalte tratado com ataque ácido a 2 minutos não apresentou diferenças significativas de microdureza em relação ao grupo tratado isoladamente com CPP-ACP. Contudo, o esmalte condicionado durante 3 e 4 minutos, apresentou um decréscimo de microdureza de superfície.
- A exposição prolongada a ataque ácido provoca alterações qualitativas no esmalte. Microscopicamente, o esmalte tratado com condicionamento ácido apresenta maiores porosidades, sendo que as porosidades são maiores no esmalte condicionado durante 4 minutos. O esmalte que foi unicamente tratado com CPP-ACP apresenta uma superfície mais uniforme, sugerindo uma maior capacidade de aumentar a microdureza de superfície.
- O aumento do tempo de condicionamento ácido parece diminuir a microdureza de superfície, apesar de criar lacunas de maior diâmetro, mais favoráveis a uma maior taxa de penetração da resina infiltrante.

Qual o timing de ataque ácido numa resina infiltrante de esmalte, após remineralização com CPP-ACP?

VI. BIBLIOGRAFIA:

- Abdullah, Z., & John, J. (2016). Minimally Invasive Treatment of White Spot Lesions - A Systematic Review. *Oral Health & Preventive Dentistry*, 14(3), 197–205. <https://doi.org/10.3290/j.ohpd.a35745>
- Amaechi, B. T., & van Loveren, C. (2013). Fluorides and Non-Fluoride Remineralization Systems. In *Toothpastes* (Vol. 23, pp. 15–26). <https://doi.org/10.1159/000350458>
- Bergstrand, F. (2011). A Review on Prevention and Treatment of Post-Orthodontic White Spot Lesions - Evidence-Based Methods and Emerging Technologies. *The Open Dentistry Journal*, 5(1), 158–162. <https://doi.org/10.2174/1874210601105010158>
- Borges, A. B., Caneppele, T. M. F., Masterson, D., & Maia, L. C. (2017). Is resin infiltration an effective esthetic treatment for enamel development defects and white spot lesions? A systematic review. *Journal of Dentistry*, 56, 11–18. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2016.10.010>
- Buzalaf, M. A. R., Hannas, A. R., & Kato, M. T. (2012). Saliva and dental erosion. *Journal of Applied Oral Science*, 20(5), 493–502. <https://doi.org/10.1590/S1678-77572012000500001>
- Cardoso, C. A. B., Cassiano, L. P. S., Costa, E. N., Souza-e-Silva, C. M., Magalhães, A. C., Grizzo, L. T., ... Buzalaf, M. A. R. (2016). Effect of xylitol varnishes on remineralization of artificial enamel caries lesions in situ. *Journal of Dentistry*, 50, 74–78. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2016.03.011>
- Carretero, L., Manso, C., Carmo, J., Ascenso, C., Carvalho, P., & Polido, M. (2017). Comparação de diferentes pre-tratamentos de esmalte em lesões de “white spots”. *Revista Portuguesa De Estomatologia, Medicina Dentária E Cirurgia Maxilofacial*, 58(supl 1). doi: 10.24873/j.rpemd.2017.12.109
- Carpenter, G. H. (2013). The Secretion, Components, and Properties of Saliva. *Annual Review of Food Science and Technology*, 4(1), 267–276. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030212-182700>
- Curzon, M. E. J., & Preston, A. J. (2004). Risk Groups: Nursing Bottle Caries/Caries in the Elderly. *Caries Research*, 38(1), 24–33. <https://doi.org/10.1159/000074359>
- Duraisamy, V., Xavier, A., Nayak, U., Reddy, V., & Rao, A. (2015). An in vitro evaluation of the demineralization inhibitory effect of F – varnish and casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate on enamel in young permanent teeth. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 7(6), 513. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.163521>
- Eckstein, A., Helms, H.-J., & Knösel, M. (2015). Camouflage effects following resin infiltration of postorthodontic white-spot lesions in vivo: One-year follow-up. *The Angle Orthodontist*, 85(3), 374–380. <https://doi.org/10.2319/050914-334.1>
- Eliasson, L., & Carlén, A. (2010). An update on minor salivary gland secretions. *European Journal of Oral Sciences*, 118(5), 435–442. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2010.00766.x>
- Elkassas, D., & Arafa, A. (2014). Remineralizing efficacy of different calcium-phosphate

- and fluoride based delivery vehicles on artificial caries like enamel lesions. *Journal of Dentistry*, 42(4), 466–474. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2013.12.017>
- Featherstone, J. D. B. (2008). Dental caries: A dynamic disease process. *Australian Dental Journal*, 53(3), 286–291. <https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.2008.00064.x>
- Featherstone, J. D. B., & Rodgers, B. E. (1981). Effect of Acetic, Lactic and other Organic Acids on the Formation of Artificial Carious Lesions. *Caries Research*, 15(5), 377–385. <https://doi.org/10.1159/000260541>
- Fejerskov, O. (2004). Changing paradigms in concepts on dental caries: Consequences for oral health care. *Caries Research*, 38(3), 182–191. <https://doi.org/10.1159/000077753>
- Ferreira, J. M. S., Aragão, A. K. R., Rosa, A. D. B., Sampaio, F. C., & Menezes, V. A. De. (2009). Therapeutic effect of two fluoride varnishes on white spot lesions: a randomized clinical trial. *Brazilian Oral Research*, 23(4), 446–451.
- Fischer, E. R., Hansen, B. T., Nair, V., Hoyt, F. H., & Dorward, D. W. (2012). Scanning Electron Microscopy. In *Current Protocols in Microbiology* (Vol. 4, pp. 79–86). Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc02b02s25>
- Gelani, R., Zandona, A., Lippert, F., Kamocka, M., & Eckert, G. (2014). In Vitro Progression of Artificial White Spot Lesions Sealed With an Infiltrant Resin. *Operative Dentistry*, 39(5), 481–488. <https://doi.org/10.2341/13-202-L>
- Gomez, J. (2015). Detection and diagnosis of the early caries lesion. *BMC Oral Health*, 15(S1), S3. <https://doi.org/10.1186/1472-6831-15-S1-S3>
- González-Cabezas, C. (2010). The Chemistry of Caries: Remineralization and Demineralization Events with Direct Clinical Relevance. *Dental Clinics of North America*, 54(3), 469–478. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2010.03.004>
- Grund, K., Goddon, I., Schüller, I. M., Lehmann, T., & Heinrich-Weltzien, R. (2015). Clinical consequences of untreated dental caries in German 5- and 8-year-olds. *BMC Oral Health*, 15(1), 140. <https://doi.org/10.1186/s12903-015-0121-8>
- Güçlü, Z. A., Alaçam, A., & Coleman, N. J. (2016). A 12-Week Assessment of the Treatment of White Spot Lesions with CPP-ACP Paste and/or Fluoride Varnish. *BioMed Research International*, 2016, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2016/8357621>
- Gurdogan, E. B., Ozdemir-Ozenen, D., & Sandalli, N. (2017). Evaluation of Surface Roughness Characteristics Using Atomic Force Microscopy and Inspection of Microhardness Following Resin Infiltration with Icon ®. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry*, 29(3), 201–208. <https://doi.org/10.1111/jerd.12279>
- Hara, A. T., & Zero, D. T. (2014). The Potential of Saliva in Protecting against Dental Erosion. In *Erosive Tooth Wear: From Diagnosis to Therapy* (Vol. 25, pp. 197–205). <https://doi.org/10.1159/000360372>
- Ismail, A. I., Tellez, M., Pitts, N. B., Ekstrand, K. R., Ricketts, D., Longbottom, C., ... Zandona, A. (2013). Caries management pathways preserve dental tissues and promote oral health. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 41(1), e12–e40. <https://doi.org/10.1111/cdoe.12024>
- J Pytko-Poloneczyk, J., Jakubik, A., Przeklasa-Bierowiec, A., & Muszynska, B. (2017). Artificial saliva and its use in biological experiments. *Journal of Physiology and*

- Pharmacology : An Official Journal of the Polish Physiological Society*, 68(6), 807–813. <https://doi.org/10.1017/S0047404517000161>
- Jo, S.-Y., Chong, H.-J., Lee, E.-H., Chang, N.-Y., Chae, J.-M., Cho, J.-H., ... Kang, K.-H. (2014). Effects of various toothpastes on remineralization of white spot lesions. *The Korean Journal of Orthodontics*, 44(3), 113. <https://doi.org/10.4041/kjod.2014.44.3.113>
- Khoroushi, M., & Kachuie, M. (2017). Prevention and Treatment of White Spot Lesions in Orthodontic Patients. *Contemporary Clinical Dentistry*, 8(1), 11–19. https://doi.org/10.4103/ccd.ccd_216_17
- Lapenaite, E., Lopatiene, K., & Ragauskaitė, A. (2016). Prevention and treatment of white spot lesions during and after fixed orthodontic treatment: A systematic literature review. *Stomatologija*, 18(1), 3–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27649610>
- Lausch, J., Paris, S., Selje, T., Dörfer, C. E., & Meyer-Lueckel, H. (2015). Resin Infiltration of Fissure Caries with Various Techniques of Pretreatment in vitro. *Caries Research*, 49(1), 50–55. <https://doi.org/10.1159/000366082>
- Lee, J.-H., Kim, D.-G., Park, C.-J., & Cho, L.-R. (2013). Minimally invasive treatment for esthetic enhancement of white spot lesion in adjacent tooth. *The Journal of Advanced Prosthodontics*, 5(3), 359. <https://doi.org/10.4047/jap.2013.5.3.359>
- Leung, V. W.-H., & Darvell, B. W. (1997). Artificial salivas for in vitro studies of dental materials. *Journal of Dentistry*, 25(6), 475–484. [https://doi.org/10.1016/S0300-5712\(96\)00068-1](https://doi.org/10.1016/S0300-5712(96)00068-1)
- Li, J., Xie, X., Wang, Y., Yin, W., Antoun, J. S., Farella, M., & Mei, L. (2014). Long-term remineralizing effect of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate (CPP-ACP) on early caries lesions in vivo: A systematic review. *Journal of Dentistry*, 42(7), 769–777. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2014.03.015>
- Li, X., Wang, J., Joiner, A., & Chang, J. (2014). The remineralisation of enamel: a review of the literature. *Journal of Dentistry*, 42, S12–S20. [https://doi.org/10.1016/S0300-5712\(14\)50003-6](https://doi.org/10.1016/S0300-5712(14)50003-6)
- Lippert, F., & Lynch, R. J. M. (2014). Comparison of Knoop and Vickers surface microhardness and transverse microradiography for the study of early caries lesion formation in human and bovine enamel. *Archives of Oral Biology*, 59(7), 704–710. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2014.04.005>
- Locker, D., & Quiñonez, C. (2009). Functional and psychosocial impacts of oral disorders in Canadian adults: a national population survey. *Journal (Canadian Dental Association)*, 75(7), 521. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19744362>
- Lussi, A., Schlueter, N., Rakhmatullina, E., & Ganss, C. (2011). Dental erosion - An overview with emphasis on chemical and histopathological aspects. *Caries Research*, 45(SUPPL. 1), 2–12. <https://doi.org/10.1159/000325915>
- Marsh, P. D., Do, T., Beighton, D., & Devine, D. A. (2016). Influence of saliva on the oral microbiota. *Periodontology* 2000, 70(1), 80–92. <https://doi.org/10.1111/prd.12098>
- Mehta, R., Nandlal, B., & Prashanth, S. (2013). Comparative evaluation of remineralization potential of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate

- and casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate fluoride on artificial enamel white spot lesion: An in vitro light fluorescence study. *Indian Journal of Dental Research*, 24(6), 681. <https://doi.org/10.4103/0970-9290.127610>
- Memarpour, M., Soltanimehr, E., & Sattarahmady, N. (2015). Efficacy of calcium- and fluoride-containing materials for the remineralization of primary teeth with early enamel lesion. *Microscopy Research and Technique*, 78(9), 801–806. <https://doi.org/10.1002/jemt.22543>
- Meyer-Lueckel, H., & Paris, S. (2010). Infiltration of Natural Caries Lesions with Experimental Resins Differing in Penetration Coefficients and Ethanol Addition. *Caries Research*, 44(4), 408–414. <https://doi.org/10.1159/000318223>
- Meyer-Lueckel, H., Paris, S., & Kielbassa, A. M. (2007). Surface Layer Erosion of Natural Caries Lesions with Phosphoric and Hydrochloric Acid Gels in Preparation for Resin Infiltration. *Caries Research*, 41(3), 223–230. <https://doi.org/10.1159/000099323>
- Neuhaus, K. W., Jost, F., Perrin, P., & Lussi, A. (2015). Impact of different magnification levels on visual caries detection with ICDAS. *Journal of Dentistry*, 43(12), 1559–1564. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2015.09.002>
- Oliveira, G. M. S., Ritter, A. V., Heymann, H. O., Swift, E., Donovan, T., Brock, G., & Wright, T. (2014). Remineralization effect of CPP-ACP and fluoride for white spot lesions in vitro. *Journal of Dentistry*, 42(12), 1592–1602. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2014.09.004>
- Paris, S., & Meyer-Lueckel, H. (2012). The potential for resin infiltration technique in dental practice. *Dental Update*, 39(9), 623–6, 628. Retrieved from <http://europepmc.org/abstract/MED/23479851%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23479851>
- Paris, S., Schwendicke, F., Seddig, S., Müller, W.-D., Dörfer, C., & Meyer-Lueckel, H. (2013). Micro-hardness and mineral loss of enamel lesions after infiltration with various resins: Influence of infiltrant composition and application frequency in vitro. *Journal of Dentistry*, 41(6), 543–548. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2013.03.006>
- Poggio, C., Lombardini, M., Vigorelli, P., & Ceci, M. (2013). Analysis of dentin/enamel remineralization by a CPP-ACP paste: AFM and SEM study. *Scanning*, 35(6), 366–374. <https://doi.org/10.1002/sca.21077>
- Prajapati, D., Nayak, R., Pai, D., Upadhya, N., Bhaskar, V. K., & Kamath, P. (2017). Effect of Resin Infiltration on Artificial Caries: An in vitro Evaluation of Resin Penetration and Microhardness. *International Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, 10(3), 250–256. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10005-1445>
- Proctor, G. B. (2016). The physiology of salivary secretion. *Periodontology 2000*, 70(1), 11–25. <https://doi.org/10.1111/prd.12116>
- Reema, S. D., Lahiri, P. K., & Roy, S. Sen. (2014). Review of casein phosphopeptides-amorphous calcium phosphate. *The Chinese Journal of Dental Research: The Official Journal of the Scientific Section of the Chinese Stomatological Association (CSA)*, 17(1), 7–14. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25028684>
- Rugg-Gunn, A. (2013). Dental Caries: Strategies to control this preventable disease. *Acta Medica Academica*, 42(2), 117–130. <https://doi.org/10.5644/ama2006-124.80>

- Selwitz, R. H., Ismail, A. I., & Pitts, N. B. (2007). Dental caries. *The Lancet*, 369(9555), 51–59. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60031-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60031-2)
- Shivakumar, B., & Shivanna, V. (2011). Novel treatment of white spot lesions: A report of two cases. *Journal of Conservative Dentistry*, 14(4), 423. <https://doi.org/10.4103/0972-0707.87217>
- Shivakumar, K., Prasad, S., & Chandu, G. (2009). International Caries Detection and Assessment System: A new paradigm in detection of dental caries. *Journal of Conservative Dentistry: JCD*, 12(1), 10–6. <https://doi.org/10.4103/0972-0707.53335>
- Struzycka, I. (2014). The oral microbiome in dental caries. *Polish Journal of Microbiology*, 63(2), 127–35. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25115106>
- Subramaniam, P., Girish Babu, K., & Lakhota, D. (2014). Evaluation of penetration depth of a commercially available resin infiltrate into artificially created enamel lesions: An in vitro study. *Journal of Conservative Dentistry*, 17(2), 146. <https://doi.org/10.4103/0972-0707.128054>
- Tao, S., Zhu, Y., Yuan, H., Tao, S., Cheng, Y., Li, J., & He, L. (2018). Efficacy of fluorides and CPP-ACP vs fluorides monotherapy on early caries lesions: A systematic review and meta-analysis. *PLOS ONE*, 13(4), e0196660. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196660>
- Teruel, J. de D., Alcolea, A., Hernández, A., & Ruiz, A. J. O. (2015). Comparison of chemical composition of enamel and dentine in human, bovine, porcine and ovine teeth. *Archives of Oral Biology*, 60(5), 768–775. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2015.01.014>
- Thabitha Rani, S., Manjula, M., Rajendra Reddy, E., VinayKumar, L., Ajay Mohan, T., & Sowmya, B. (2016). Evaluation of remineralizing potential of Calcium Sucrose Phosphate and CPP-ACP: An in vitro study. *Pediatric Dental Journal*, 26(3), 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.pdj.2016.07.002>
- Tikhonova, S. M., Feine, J. S., Pustavoitava, N. N., & Allison, P. J. (2014). Reproducibility and diagnostic outcomes of two visual-tactile criteria used by dentists to assess caries lesion activity: A cross-over study. *Caries Research*, 48(2), 126–136. <https://doi.org/10.1159/000353094>
- Torres, C. R. G., Borges, A. B., Torres, L. M. S., Gomes, I. S., & de Oliveira, R. S. (2011). Effect of caries infiltration technique and fluoride therapy on the colour masking of white spot lesions. *Journal of Dentistry*, 39(3), 202–207. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2010.12.004>
- Torres, C., Rosa, P., Ferreira, N., & Borges, A. B. (2012). Effect of Caries Infiltration Technique and Fluoride Therapy on Microhardness of Enamel Carious Lesions. *Operative Dentistry*, 37(4), 363–369. <https://doi.org/10.2341/11-070-L>
- van 't Hof, W., Veerman, E. C. I., Nieuw Amerongen, A. V., & Ligtenberg, A. J. M. (2014). Antimicrobial defense systems in saliva. *Monographs in Oral Science*, 24, 40–51. <https://doi.org/10.1159/000358783>
- Vukosavljevic, D., Custodio, W., Buzalaf, M. A. R., Hara, A. T., & Siqueira, W. L. (2014). Acquired pellicle as a modulator for dental erosion. *Archives of Oral Biology*, 59(6), 631–638. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2014.02.002>

- Wang, Y., Wang, X., Jiang, W., Wang, K., Luo, J., Li, W., ... Zhang, L. (2018). Antimicrobial peptide GH12 suppresses cariogenic virulence factors of *Streptococcus mutans*. *Journal of Oral Microbiology*, 10(1), 1442089. <https://doi.org/10.1080/20002297.2018.1442089>
- West, N. X., & Joiner, A. (2014). Enamel mineral loss. *Journal of Dentistry*, 42, S2–S11. [https://doi.org/10.1016/S0300-5712\(14\)50002-4](https://doi.org/10.1016/S0300-5712(14)50002-4)
- Yim, H.-K., Min, J.-H., Kwon, H.-K., & Kim, B.-I. (2014). Modification of surface pretreatment of white spot lesions to improve the safety and efficacy of resin infiltration. *The Korean Journal of Orthodontics*, 44(4), 195. <https://doi.org/10.4041/kjod.2014.44.4.195>
- Zafar, M. S., & Ahmed, N. (2015). The effects of acid etching time on surface mechanical properties of dental hard tissues. *Dental Materials Journal*, 34(3), 315–320. <https://doi.org/10.4012/dmj.2014-083>
- Zhang, Y.-R., Du, W., Zhou, X.-D., & Yu, H.-Y. (2014). Review of research on the mechanical properties of the human tooth. *International Journal of Oral Science*, 6(2), 61–69. <https://doi.org/10.1038/ijos.2014.21>